

JOÃO CÉSAR ZIELAK

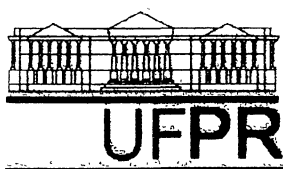
**DESENVOLVIMENTO DE OSSO OVINO PARTICULADO E AVALIAÇÃO
COMPARATIVA *IN VIVO* DO POTENCIAL OSTEOPROMOTOR APLICADO À
ODONTOLOGIA**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor no Curso de
Doutorado em Processos Biotecnológicos, área
de concentração Saúde Humana e Animal, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadores:
Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias
Profa. Dra. Ana Lúcia Nicastri

CURITIBA

2005



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos dezoito dias do mês de abril de 2005 no Salão Nobre do Setor de Tecnologia do Prédio da Administração do Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Vigésima Nona Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Allan Fernando Giovanini (UNICENP), Cassius Carvalho Torres-Pereira (UFPR), Celso Yamashita (UNIVALI), João Caetano Fortes (UFPR) e Prof Dr. Álvaro Luiz Mathias, orientador da tese.

Às 16:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **João Cesar Zielak** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“Desenvolvimento de Osso Ovino Particulado e Avaliação Comparativa *in vivo* do Potencial Osteopromotor Aplicado à Odontologia”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca atribuiu os seguintes conceitos: Prof Dr. Allan Fernando Giovanini A, Prof Dr Cassius Carvalho Torres-Pereira 4; Prof Dr Celso Yamashita A; Prof Dr João Caetano Fortes A; e Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias A.

A média obtida resultou na APROVAÇÃO do candidato, com conceito final A (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 18 de abril de 2005.


Prof Dr Allan Fernando Giovanini


Prof Dr Cassius C Torres-Pereira


Prof Dr Celso Yamashita


Prof Dr João Caetano Fortes


Prof Dr Álvaro Luiz Mathias

À Deus,

Makeli,
Denise,
e Ofélia,

Com muito amor...

AGRADECIMENTOS

À Deus pela iluminação, sem Ele nada poderia ter feito.

Ao professor Dr. Álvaro Luiz Mathias, pelo desprendimento e orientação.

À professora Dra. Ana Lúcia Nicastri, principalmente por acreditar no trabalho.

Ao professor Dr. Allan Fernando Giovanini, pelo auxílio técnico e amizade.

Aos meus pais e demais familiares que suportaram a ausência e o cansaço. Em especial à Makeli, por conseguir manter a proximidade, apesar da distância no pensamento, pela paciência e compreensão (eu te amo muito!).

Ao Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, pela oportunidade.

Ao UNICENP por abrir-me as portas como se estivesse em casa! Especialmente à Coordenadora do Curso de Odontologia, professora (e grande incentivadora) Maria da Graça Kfoury Lopes, à Médica Veterinária diretora do Biotério Maria Fernanda Pioli Torres e demais funcionários da Unidade, e à Sheila Beatriz Budal Rycheta, incansável laboratorista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 USO DE OSTEOPROMOTORES EM HUMANOS.....	4
2.2 USO DE MEMBRANAS EM HUMANOS.....	5
2.3 EXPERIMENTAÇÃO LABORATORIAL COM MEMBRANAS.....	8
2.4 EXPERIMENTAÇÃO LABORATORIAL SEM O USO DE MEMBRANAS.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 OBTENÇÃO E PREPARO DOS BIOMATERIAIS.....	16
3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	18
3.3 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA.....	22
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	22
3.5 MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	23
3.6 ANÁLISE DAS IMAGENS.....	25
3.6.1 Imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
3.6.2 Imagens obtidas em microscopia de luz (ML).....	26
4 RESULTADOS.....	28
4.1 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE OSSO OVINO.....	28
4.1.1 Comparação das partículas de biomateriais por MEV antes do ato cirúrgico.....	29
4.1.2 Comparação das partículas de biomateriais por ML após a inserção e Osteopromocão.....	29
4.2 MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS DOS ANIMAIS.....	30
4.2.1 Grupos I e II (C, B, L, BL; 1 e 3 semanas).....	30
4.2.2 Grupos V e VI (Sa e Se; 1 e 3 semanas).....	32
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	35
4.3.1 Grupos I e II (C, B, L, BL; 1 e 3 semanas).....	35
4.3.1.1 Exposição Radicular.....	35
4.3.1.2 Diâmetro de Fibras e Feixes.....	37
4.3.1.3 Área com Glóbulos de provável mineralização.....	38
4.3.2 Grupos V e VI (Sa e Se; 1 e 3 semanas).....	41
4.3.2.1 Exposição Radicular.....	41
4.3.2.2 Diâmetro de Fibras e Feixes.....	44

4.3.2.3	Área com Glóbulos de Provável Mineralização.....	45
4.3.3	Normalização dos Resultados em MEV.....	52
4.4	MICROSCOPIA DE LUZ – GRUPOS III E IV (C, B, L, BL, Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS).....	53
5	DISCUSSÕES	65
6	CONCLUSÃO	80
7	REFERÊNCIAS	81
8	ANEXO: ARTIGO A SER SUBMETIDO	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: AÇÃO DA BROCA SOBRE MANDÍBULA.....	17
FIGURA 2: MESA CIRÚRGICA.....	21
FIGURA 3: LESÃO ÓSSEA ARTIFICIAL.....	22
FIGURA 4: PINÇAGEM DE TECIDO CICATRICIAL SUPERFICIAL DA REGIÃO DO ENXERTO.....	23
FIGURA 5: SOLUÇÃO QUELANTE EM MESA AGITADORA E PHMETRO.....	24
FIGURA 6: DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS DE OSSO OVINO (S).....	28
FIGURA 7: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO I, 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM B, L, BL OU C.....	31
FIGURA 8: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO II, 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM B, L, BL OU C.....	31
FIGURA 9: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO V-a, 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM Sa.....	33
FIGURA 10: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO V-b, 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM Se.....	33
FIGURA 11: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO VI-a, 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM Sa.....	34
FIGURA 12: MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO VI-b, 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM Se.....	34
FIGURA 13: COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR NOS GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS).....	36
FIGURA 14: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO I (C, B, L, BL; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO).....	39
FIGURA 15: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO II (C, B, L, BL; 3 SEMANAS).....	40
FIGURA 16: COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR, GRUPOS V-a E VI-a (Sa; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	42
FIGURA 17: COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR, GRUPOS V-b E VI-b (Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	43
FIGURA 18: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO V-a (Sa; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO).....	47
FIGURA 19: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO V-b (Se; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO).....	48
FIGURA 20: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO VI-a (Sa; 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	49
FIGURA 21: ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO VI-b (Se; 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	50
FIGURA 22: CÁLCULO DO DIÂMETRO DO DEFEITO NA REGIÃO MEDIANA, AMOSTRA 1BL3.....	53
FIGURA 23: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS CONTROLE 1 E 3 SEMANAS.....	55
FIGURA 24: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE BIOCERÂMICA 1 E 3 SEMANAS.....	57
FIGURA 25: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS OSSO LIOFILIZADO COMERCIAL 1 E 3 SEMANAS.....	58

FIGURA 26: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE BIOCERÂMICA COM OSSO LIOFILIZADO COMERCIAL 1 E 3 SEMANAS.....	60
FIGURA 27: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE OSSO OVINO AUTOCLAVADO 1 E 3 SEMANAS.....	61
FIGURA 28: MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE OSSO OVINO ESTERILIZADO COM ÓXIDO DE ETILENO 1 E 3 SEMANAS.....	63
FIGURA 29: PROJEÇÃO DO TECIDO ÓSSEO EM DIREÇÃO À REGIÃO DE ENXERTO.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	19
TABELA 2 - PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS OBTIDOS POR MEV E ANALISADOS PELO PROGRAMA IMAGE TOOL 2.00.....	25
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES BIOLÓGICAS A PARTIR DA MICROSCOPIA DE LUZ.....	27
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DE BIOMATERIAIS POR MEV.....	29
TABELA 5 - TAMANHO MÁXIMO DE PARTÍCULAS APÓS OSTEOPROMOÇÃO (ML).....	30
TABELA 6 - VALORES (%) DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR EM RELAÇÃO À ÁREA DE DEFEITO, GRUPOS I E II (C, B, L E BL; 1 E 3 SEMANAS).....	37
TABELA 7 - DIÂMETRO DE FIBRAS E FEIXES AVALIADOS POR MEV, GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS).....	38
TABELA 8 - ÁREAS COM GLÓBULOS OBSERVADAS EM MEV, GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS).....	41
TABELA 9 - VALORES (%) DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR EM RELAÇÃO À ÁREA DE DEFEITO, GRUPOS V E VI (Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	44
TABELA 10 - DIÂMETRO DE FIBRAS/FEIXES OBSERVADOS EM MEV, GRUPOS V E VI (Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	45
TABELA 11 - ÁREAS COM GLÓBULOS OBSERVADAS EM MEV, GRUPOS V E VI (Sa e Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO).....	51
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS DE MEV NORMALIZADAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE 1 SEMANA.....	52
TABELA 13 - VALORES MÉDIOS DOS DIÂMETROS DE DEFEITO.....	54
TABELA 14 - RESULTADOS DAS CONDIÇÕES BIOLÓGICAS OBSERVADAS EM MICROSCOPIA DE LUZ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MONITORAMENTO.....	64

LISTA DE SIGLAS

B	- BIOCERÂMICA
BL	- BIOCERÂMICA + OSSO BOVINO LIOFILIZADO COMERCIAL
C	- CONTROLE
GI	- GRUPO I
GII	- GRUPO II
GIII	- GRUPO III
GIV	- GRUPO IV
GV	- GRUPO V
GV-a	- GRUPO V-a
GV-b	- GRUPO V-b
GVI	- GRUPO VI
GVI-a	- GRUPO VI-a
GVI-b	- GRUPO VI-b
IA	- INFLAMAÇÃO AGUDA
IC	- INFLAMAÇÃO CRÔNICA
ICG-CE	- INFLAMAÇÃO CRÔNICA GRANULOMATOSA – CORPO ESTRANHO
ICG-CL	- INFLAMAÇÃO CRÔNICA GRANULOMATOSA – CÉLULA DE LANGHANS
L	- OSSO BOVINO LIOFILIZADO COMERCIAL
MEV	- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA
ML	- MICROSCOPIA DE LUZ
PTFe	- POLITETRAFLUORETILENO
RC	- REPARO CICATRICIAL
RT	- REPARO TECIDUAL
RTG	- REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA
S	- OSSO OVINO
S1	- OSSO OVINO TIPO 1
S2	- OSSO OVINO TIPO 2
S3	- OSSO OVINO TIPO 3
SA	- ÁREA SELECIONADA
Sa	- OSSO OVINO AUTOCLAVADO
Se	- OSSO OVINO ESTERILIZADO COM ÓXIDO DE ETILENO

RESUMO

O enxerto ósseo é um procedimento amplamente realizado na Odontologia atual. Vários biomateriais são empregados para este fim. A neoformação do osso pode ser auxiliada pela presença de osteopromotores (osteointdutores e/ou osteocondutores) com atividades histológicas e clínicas conhecidas. Estudos em animais podem esclarecer a resposta óssea à inserção desses biomateriais. Este trabalho demonstrou, através de um estudo exploratório, o desenvolvimento de dois biomateriais particulados de origem ovina, com diferença no processo de esterilização das partículas obtidas: (Se) esterilização por óxido de etileno; (Sa) esterilização por autoclavagem. Estes biomateriais e outros dois comerciais foram avaliados através da microscopia de varredura (MEV) e de luz (ML) em relação aos aspectos do reparo ósseo em estudo *in vivo* com ratos (WISTAR), em um protocolo cirúrgico experimental que também envolveu os tecidos periodontais. Os testes foram realizados comparando as respostas teciduais do β -trifosfato de cálcio (B), do osso bovino liofilizado desproteínado (L), da associação destes dois (BL), do Sa e Se, e de um grupo controle (C), tanto a 1 quanto a 3 semanas. Com auxílio do programa Image Tool 2.00, os parâmetros avaliados a partir das imagens de MEV foram: tamanho de partículas, exposição radicular, diâmetro de estruturas filiformes (fibras/feixes), glóbulos de superfície. Nas imagens de ML avaliou-se: tamanho de partículas, diâmetro de defeito, tipo de tecido inflamatório reacional. Um total de 96 animais foi usado: Grupo I, 1 semana, MEV (20 animais, n = 5, C, B, L, BL); Grupo II, 3 semanas, MEV (20 animais, n = 5, C, B, L, BL); Grupo III, 1 semana, ML (18 animais, n = 3, C, B, L, BL, Sa, Se); Grupo IV, 3 semanas, ML (18 animais, n = 3, C, B, L, BL, Sa, Se); Grupo V, 1 semana, MEV (10 animais, n = 5, Sa e Se); Grupo VI, 3 semanas, MEV (10 animais, n = 5, Sa e Se). Os resultados em MEV demonstraram que todos os biomateriais favoreceram a manutenção do volume tecidual, e que Se e Sa produziram um estágio mais maduro de cicatrização. Na microscopia de luz, todos os biomateriais produziram um tecido inflamatório típico do granuloma de corpo estranho, sendo que nas amostras de Sa, o reparo ósseo produziu osso maduro na região do enxerto em 3 semanas. Sugeriu-se, portanto, que o osso ovino particulado possui características potencialmente osteopromotoras.

Palavras-chaves: Enxerto ósseo - Osso ovino – Reparo periodontal

ABSTRACT

Bone grafting is a procedure widely accomplished in the current Dentistry. Several biomaterials are used for this purpose. The neoformation of bone can be aided by bone substitutes (bone inductive and/or conductive) with well-known histological and clinical activities. Studies in animals can clarify the bone response to the application of these biomaterials. This work demonstrated an exploratory study and the development of two particle biomaterials of ovine bone origin, with difference in the process of sterilization of the obtained particles: (Se) ethylene oxide sterilization; and (Sa) autoclave sterilization. These and other two commercially available biomaterials were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and light microscopy (LM) regarding the bone repair aspects of an *in vivo* study with rats (WISTAR), within an experimental surgical protocol that also involved the periodontal tissues. The tests were accomplished comparing the tissue responses to β -tricalcium phosphate (B), to lyophilized deproteinated bovine bone (L), to the association of these two (BL), to Sa, to Se, and to a control group (C), at 1 and 3-week period. With *Image Tool 2.00* software, the evaluated parameters collected by SEM analysis were: size of particles, root exposure, diameter of filiform structures (fibers/bundles), globulii surface. The parameters evaluated in the LM images were: size of particles, defect diameter, and type of tissue inflammatory reaction. A total of 96 animals was used: Group I, 1 week, SEM (20 animals, n = 5, C, B, L, BL); Group II, 3 weeks, SEM (20 animals, n = 5, C, B, L, BL); Group III, 1 week, LM (18 animals, n = 3, C, B, L, BL, Sa, Se); Group IV, 3 weeks, LM (18 animals, n = 3, C, B, L, BL, Sa, Se); Group V, 1 week, SEM (10 animals, n = 5, Sa and Se); Group VI, 3 weeks, SEM (10 animals, n = 5, Sa and Se). SEM images demonstrated that all biomaterials favored the maintenance of tissue volume, and that Se and Sa produced a more mature cicatrization stage. In the light microscopy, all the biomaterials produced a typical inflammatory tissue of the foreign body granuloma, and in Sa samples, the bone repair produced mature bone at the grafting site in 3 weeks. Thus, it is suggested that the particle ovine bone demonstrates to be a potentially biomaterial of bone promotion.

Keywords: Bone grafting - Ovine bone – Periodontal repair

1 INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo é recomendado para defeitos ósseos que comprometem a anatomia normal, e em última instância a função do tecido mineralizado. Doença ou acidentes podem causar tais defeitos. A neoformação óssea em indivíduos que apresentam perdas consideráveis do tecido é de grande importância para a Odontologia e Medicina. Por exemplo, SERVICE (2000) relata que aproximadamente 450 mil enxertos ósseos são realizados anualmente somente nos Estados Unidos. Várias substâncias têm sido desenvolvidas com o objetivo de estimular ou auxiliar a neoformação do osso original, ou seja, promover um reparo ideal no local de interesse, que consiste num processo diferente da regeneração óssea propriamente dita - mesmo assim, o termo empregado pela maioria dos autores é regeneração (ZIELAK¹, 1998).

BOSH et al. (1998) demonstram que uma reconstrução óssea espontânea não acontece em defeitos cranianos de cinco milímetros de diâmetro, em ratos entre 5 e 6 meses de idade. Isto sugere que para o reparo de grandes áreas, um agente de resposta positiva deve ser adicionado ao local do defeito ósseo. Assim, as chamadas substâncias osteopromotoras, substitutos ósseos, ou biomateriais de enxerto ósseo têm sido estudados há muito tempo. VAN DE PUTTE & URIST, já em 1965, estudam a osteogênese dentro de implantes intramusculares de matriz óssea bovina descalcificada. GENDLER (1986) estuda o uso de matriz óssea bovina descalcificada em implantes subcutâneos, onde múltiplos centros de osteogênese endocondral são observados com subsequente reabsorção do biomaterial, e mais tarde, sua substituição por novo osso. Ainda, RODRIGUEZ *et al.* (1997) encontram resultados positivos no uso de osso bovino não desmineralizado aplicado a defeitos de tíbias de ratos com tamanho de três milímetros.

1.1 JUSTIFICATIVA

O tecido ósseo é composto por uma porção orgânica, principalmente proteínas, e uma porção mineral, principalmente hidroxiapatita, e água. A formação de tecido ósseo é realizada pelos osteoblastos (OSBORN & TEN CATE, 1988; KATCHBURIAN & ARANA, 1999). Assim, quando se faz necessário a reposição deste tecido, principalmente quando o remodelamento local não é capaz de devolver o volume originalmente perdido, tem-se como opção o enxerto. Vários métodos são atualmente conhecidos: implantação de fragmentos maiores (enxerto em bloco) e materiais particulados, de origem autogênica (do próprio indivíduo), isogênica (de outro indivíduo, geneticamente idêntico), alogênica (de outro indivíduo, porém de mesma espécie), xenogênica (de indivíduo de espécie diferente) e aloplástica (sintético).

Justifica-se o desenvolvimento de trabalhos experimentais com enxerto ósseo uma vez que está comprovado que a neoformação do tecido possa ser auxiliada pela presença de biomateriais com atividades histológicas e clínicas conhecidas (DAMIEN *et al.*, 1995), que ajudem no restabelecimento tanto da composição quanto da atividade das células envolvidas. Estudos em animais podem esclarecer a resposta óssea à inserção desses biomateriais, além de auxiliar na obtenção de informações sobre os mecanismos e seqüências do processo de reparo no enxerto (CAPLANIS *et al.*, 1998; NEWMAN *et al.*, 2004).

GRIMM *et al.* (2001) relatam que o osso ovino tem características muito similares às do osso humano, podendo, portanto, ser considerado como material de enxerto potencial. Apesar disto, relatos sobre o desenvolvimento e resposta tecidual de um biomaterial com origem ovina são escassos (YOUSOFI & DEHGHANI, 2001).

1.2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho relata um estudo exploratório para o desenvolvimento de dois biomateriais de origem ovina. Um osso ovino particulado foi submetido a dois diferentes métodos de esterilização: 1) método físico-químico: esterilização por óxido de etileno, considerado eficiente para biomateriais de enxerto (KURUP *et al.*, 2004), apesar de diminuir a ação de proteínas morfogênicas de osso (PEKKARINEN *et al.*, 2004); e 2) método físico: esterilização por autoclavagem, que desnatura os fatores de crescimento existentes nas partículas (CHENG *et al.*, 2005). Assim, dois tipos de biomateriais de enxerto ósseo com respostas teciduais provavelmente distintas foram produzidos.

Concomitantemente, um protocolo de avaliação de potencial de osteopromoção foi utilizado para biomateriais comerciais. Esta técnica foi baseada na avaliação de imagens obtidas por microscopia de varredura e de luz, onde foram analisados os aspectos do reparo ósseo em estudo *in vivo* com ratos, num protocolo cirúrgico experimental que também envolveu os tecidos periodontais.

Os testes foram realizados com biomateriais de respostas teciduais distintas (β -trifosfato de cálcio e osso bovino liofilizado desproteínado) isolados ou associados. O tempo de monitoramento variou para estimar a cicatrização tecidual no pós-cirúrgico. Os dois biomateriais ovinos obtidos também foram avaliados pela mesma metodologia e foram comparados aos produtos comerciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 USO DE OSTEOPROMOTORES EM HUMANOS

Clinicamente, os biomateriais de enxerto ósseo vêm sendo amplamente utilizados. CARRANZA, Jr. *in* **Glickman: Periodontia Clínica** (1992) sugere a utilização criteriosa de substâncias como a hidroxiapatita de coral, osso descalcificado e liofilizado (homógeno) em defeitos periodontais.

No estudo da osteopromoção aplicada a seres humanos, JUNQUEIRA & CARNEIRO *in* **Histologia Básica** (1995) descrevem uma técnica de avaliação da velocidade de formação óssea através da utilização da tetraciclina, antibiótico fluorescente que permite a constatação do crescimento ósseo - diminuído em doenças como a osteomalácia, e aumentado em doenças como a osteíte fibrosa cística.

FROUM *et al.* (1998) estudam a utilização de biocerâmica em comparação à curetagem óssea como único tratamento, em defeitos ósseos de periodonto humano. Observam melhores resultados clínicos para o uso da biocerâmica.

YUKNA *et al.* (1998) pesquisam o uso de hidroxiapatita inorgânica de matriz óssea bovino-derivada com um peptídeo ligante celular sintético - 15 (P-15), em defeitos periodontais humanos. A hidroxiapatita mais P-15 demonstra melhores resultados (8 a 9 vezes melhor resposta tecidual) quando comparada ao enxerto com osso desmineralizado congelado e seco, e à curetagem óssea.

LOVELACE *et al.* (1998) comparam a utilização de biocerâmica com osso desmineralizado congelado e seco, na resolução de defeitos ósseos periodontais humanos. Os autores não observam diferenças significativas após o uso de ambos em curto prazo (6 meses).

2.2 USO DE MEMBRANAS EM HUMANOS

Retornando a CARRANZA, Jr. in **Glickman: Periodontia Clínica** (1992) o uso de membranas, em especial as absorvíveis, também é indicado no tratamento de defeitos ósseos. As membranas porosas (“filtros celulares” que permitem a passagem, ou a migração de células de certo tamanho) têm se revelado mais uma boa alternativa para o reparo ósseo desejado. A técnica clínica que utiliza membranas é chamada de regeneração tecidual guiada (RTG). Quando colocada sobre a região do enxerto, as membranas impedem que o tecido epitelial, por exemplo, invada o local antes do início do desenvolvimento do tecido ósseo, que é mais lento. As membranas podem ser absorvíveis ou não-absorvíveis pelos tecidos vivos.

A principal desvantagem das membranas não absorvíveis é que estas precisam ser removidas após a detecção do aumento no volume ósseo, exigindo, portanto, uma nova intervenção cirúrgica. Tais membranas são constituídas de politetrafluoretileno expandido (PTFE), e também são empregadas como filtros na purificação de soluções (BORDIGNON, 1999).

KIM *et al.* (1996) pesquisam materiais como carbonato de cálcio absorvível e membranas, num estudo envolvendo 80 pacientes com defeitos intra-ósseos. Para estes autores, tais substâncias têm efeito coadjuvante no tratamento periodontal de defeitos ósseos.

HARIS *et al.* (1998) fazem um estudo envolvendo 224 pacientes avaliados clínica e histologicamente. Os pacientes são tratados com osso sintético na obliteração de cistos intra-ósseos, tratamento de defeitos periodontais, correção de contornos e deficiências mandibulares, e necessidade de ganho ósseo para a colocação de implantes dentais após a formação de novo tecido e/ou concomitantemente à colocação do implante a aplicação do osso sintético. Em 3 meses obtêm alguns resultados clínicos e radiográficos positivos (espessamento da parede inferior de seio maxilar), sendo que

a massa de tecido ósseo necessária para a colocação dos implantes é detectada apenas entre 8 e 12 meses após enxerto. Nenhuma complicação, como infecção, inflamação ou rejeição do material enxertado é observada.

LAURELL *et al.* (1998) fazem uma revisão com extensão de 20 anos para artigos sobre o tratamento de defeitos intra-ósseos em humanos, a curetagem óssea, a curetagem acrescida de enxerto com osso desmineralizado, enxerto com osso congelado e seco, enxerto com osso autógeno e uso de membranas. Os pesquisadores afirmam que o uso da RTG é vantajoso, sendo que os defeitos precisam ser de pelo menos 4 mm de profundidade.

HARRIS (1998) compara a aplicação clínica de osso desmineralizado congelado e seco associado à hidroxiapatita porosa e membrana absorvível, ao osso desmineralizado e membrana absorvível, em defeitos ósseos bucais humanos. Relata que em ambos os procedimentos existem melhoras da situação clínica, e não percebe diferença nos procedimentos entre si.

PARASHIS *et al.* (1998) estudam a utilização de membrana absorvível (ácido poliláctico) comparada ao uso de osso desmineralizado congelado e seco. Não encontram diferenças significativas nas duas técnicas, com exceção à resolução radiográfica bem maior notada no grupo tratado com membrana absorvível.

GARG & VALCANAIA (1999) descrevem uma técnica cirúrgica com objetivo de aumentar a espessura óssea em região maxilar de humanos, permitindo assim a colocação de implantes, através de enxerto autógeno e alógeno (na proporção de 1:2 - osso da sínfise mandibular e osso desmineralizado) com a utilização adicional de membranas absorvíveis.

CORDIOLI *et al.* (1999) estudam a osseointegração de implantes auxiliada por membranas, após a colocação de próteses e conseqüente aplicação de carga sobre o

osso neoformado. Observam resultados satisfatórios tanto em curto (6 meses) quanto em longo prazos (5 anos).

BORGHETTI *et al.* (1999) estudam a utilização de membranas absorvíveis comparada ao enxerto de conjuntivo sub-epitelial, no tratamento da recessão gengival. Observam, ao longo de 6 meses, que ambas as técnicas mostram-se eficazes no recobrimento radicular.

DE LEONARDIS *et al.* (1999) comparam membranas absorvíveis (ácido polilático) associadas ao osso desmineralizado congelado e seco à aplicação de membranas somente, em defeitos ósseos de periodonto humano (12 pacientes com defeitos bilaterais de furca classe II, nos primeiros molares inferiores), com avaliações de 6 e 12 meses. Os autores observam resultados melhores após utilização de membrana concomitante ao osso desmineralizado.

VERMINO *et al.* (1999) também utilizam membranas de ácido polilático em defeitos ósseos bucais de humanos. A avaliação cirúrgica após 1 ano demonstra que ocorre uma significativa redução dos defeitos.

ALMEIDA *et al.* (1999) também demonstram resultados favoráveis na utilização clínica de matriz óssea desmineralizada e proteína morfogênica de osso ligada a hidroxiapatita reabsorvível, associada à membrana absorvível, em lesões intra-ósseas bucais causadas por problemas endodônticos e periodontais.

A partir do conhecimento do comportamento biológico das membranas, OCHOA & VACANTI (2002) descrevem a utilização de polímeros absorvíveis na construção de “moldes” com desenvolvimento de vascularização *in vitro*, que sirvam para o crescimento de células de determinado tecido, como por exemplo o osso, e que tenham uma aplicação clínica.

2.3 EXPERIMENTAÇÃO LABORATORIAL COM MEMBRANAS

LUNDGREN *et al.* (1992) usam coelhos para aplicação da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG), em defeitos cranianos de 8 mm de diâmetro. Resultados satisfatórios são obtidos no monitoramento de 6 semanas, nos defeitos tratados com membranas absorvíveis (ácido polilático) e sem o uso de outros biomateriais.

DAHLIN *et al.* (1994) estudam os efeitos da aplicação de membranas de PTFe em defeitos trans-ósseos na mandíbula de ratos. Após 12 semanas, nova entrada cirúrgica remove o tecido conjuntivo 'maduro', aplicando-se, então, as membranas. Observam na análise histológica a regeneração óssea completa após 6 semanas quando na utilização das membranas, demonstrando o efeito osteopromotor da técnica.

BARTEE & CARR (1995) realizam um experimento com membrana PTFe, tratando defeitos trans-ósseos nos ângulos mandibulares de 12 ratos, bilateralmente, sendo que um dos lados é usado como controle. Após 10 semanas, a regeneração completa é observada com a utilização das membranas, enquanto os defeitos controle apresentam pouca regeneração.

NYMAN *et al.* (1995) estudam os efeitos da membrana PTFe em defeitos ósseos segmentados em ossos longos de coelhos. Um grupo é acompanhado radiograficamente por 13 semanas e outro por 27 semanas. Os sítios controle não demonstram mudança no período de 6 semanas, enquanto os sítios experimentais mostram sinais de regeneração óssea em 2 semanas.

CRUMP *et al.* (1996) testam 3 tipos de membrana: PTFe, politetrafluoretileno denso (PTFd) e ácido polilático/base éster do ácido cítrico reabsorvível. Utilizam 30 ratos adultos com defeitos cranianos, analisados a 2 e 4 semanas. A análise histológica revela que a membrana de PTF denso está associada à maior formação óssea a 2

semanas, e a membrana de ácido polilático a 4 semanas; os autores também relatam que a membrana PTFe também permite a regeneração óssea, sendo fácil a sua remoção no pós-cirúrgico e o seu custo baixo.

BRUNEL *et al.* (1996) usam membranas absorvíveis de colágeno em crânios de 48 ratos. Exames histológicos são feitos em 10, 20 e 30 dias após as cirurgias. Observam que nos defeitos cobertos por membrana a média de regeneração óssea é da ordem de 4 vezes a dos defeitos controle. Os resultados demonstram que quanto maior o grau de *cross-linking* colágeno na membrana, menor a taxa de absorção. Porém, não observam diferenças na regeneração óssea com membranas de diferentes graus de *cross-linking*.

CAPLANIS *et al.* (1998) relatam que não houve diferença observada em testes com membrana associada a osso desmineralizado, e membrana somente, em cães, num período de 4 semanas. Para estes autores, as partículas do osso desmineralizado permanecem embebidas por tecido conjuntivo denso sem evidência de atividade metabólica óssea, e quantidades limitadas de osso são observadas nos defeitos criados.

ZAHEDI *et al.* (1998) pesquisam a influência do potencial regenerativo ósseo da membrana de colágeno bovino tipo I bifenilfosforilazida interligada (*cross-linked*). Os experimentos destes autores envolvem 25 ratos, nos quais são obtidos defeitos ósseos cirúrgicos de 5mm de diâmetro. Estudo histológico (grupos de 5 animais) é feito aos 7, 15, 30, 90 e 180 dias. Diferenças significativas na porcentagem de regeneração óssea são relatadas entre 7 e 15 dias, e entre 15 e 30 dias. Concluem que a membrana utilizada no experimento serve para procedimentos de regeneração tecidual guiada.

BOHNING *et al.* (1999) estudam os efeitos da utilização de membranas absorvíveis em defeitos cranianos de 17 ratos, nos períodos de 3, 5 e 7 semanas. Não

observam diferenças significativas nas avaliações histológicas da regeneração óssea entre defeito controle e defeito experimental.

TROMBELLI *et al.* (1999) desenvolvem um experimento em cavidade bucal de cães, baseados no princípio da regeneração tecidual guiada, adicionando um análogo da prostaglandina E1 (o misoprostol) diariamente, num intervalo de 4 semanas, em defeitos ósseos tratados com membranas PTFe. As observações histológicas sugerem que o PTFe possui um potencial para promover a regeneração óssea.

2.4 EXPERIMENTAÇÃO LABORATORIAL SEM O USO DE MEMBRANAS

Ainda em 1974, WLODARSKI *et al.* realizam um estudo comparativo de indução óssea por matriz óssea descalcificada em rato e coelho.

OIKARINEN & KORHONEN (1979) descrevem um experimento com defeitos ósseos em fíbulas de 16 ratos, comparando enxertos com matriz óssea (alógena) descalcificada por ácido a enxertos com osso autógeno, em um período de 3 meses.

Porém, nas décadas de 80 e 90 é que os estudos dos biomateriais se multiplicam. MELLONIG *et al.* (1981) comparam a atividade regenerativa do enxerto ósseo descalcificado congelado e seco, osso congelado e seco, e osso autógeno com coágulo. Os materiais são implantados dentro de defeitos cranianos, envolvidos por uma pequena câmara porosa de *nylon*, e o monitoramento (sacrifício dos animais para estudo histológico) é feito após 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Resultados positivos são observados no uso do osso descalcificado congelado e seco, sendo considerado um material potencialmente osteogênico.

GENDLER (1986) afirma que a matriz óssea descalcificada serve para situações clínicas ortopédicas e cirúrgico-reconstrutivas, através do preenchimento de defeitos ósseos e estimulação de regeneração em fraturas.

BOLANDER & BALIAN (1986) comparam a regeneração promovida por matriz óssea desmineralizada plasma-revestida, matriz óssea desmineralizada, matriz óssea desmineralizada fortificada com proteínas ósseas (extraídas com hidrocloreto de guanidina) e osso autógeno (da crista ilíaca), em defeitos cirúrgicos de 2 cm na ulna de 48 coelhos, periodicamente monitorados por raio-X. De acordo com uma pesquisa de resistência à torsão realizada após 12 semanas de enxertamento tem-se: a ulna normal mais resistente do que a ulna enxertada com matriz plasma-revestida; esta última e a ulna com enxerto autógeno têm resistências equivalentes; e o enxerto de matriz reforçada com proteínas ósseas é mais resistente do que os outros com matriz sem reforço.

Com o aumento dos conhecimentos no campo da Biologia Celular e Molecular, os sinais moleculares passam a ser analisados como elementos-chave no estudo do tecido mineralizado. Por exemplo, SPENCER *et al.* (1991) em estudo sobre o metabolismo ósseo, observam que o fator de crescimento insulina-similar I (IGF-I) é responsável por aumento significativo de cortical óssea, em ratos injetados com a substância. Os autores verificam que os efeitos do IGF-I são dependentes da idade, sendo que não afetam ratos 'jovens' (até 1 ano de idade). Demonstram que o fator de crescimento referido estimula osteoblastos e diminui o número de osteoclastos, mediando o efeito promotor do hormônio de crescimento (GH), mas não influenciando a atividade de reabsorção óssea.

Os biomateriais de enxerto ósseo também passam a ser utilizadas no desenvolvimento das técnicas de implantodontia. SHIROTA *et al.* (1994) pesquisam a diferença na osseointegração de implantes de titânio revestidos ou não com hidroxiapatita. O experimento envolve 12 ratos de 2 anos de idade e implantes na tíbia, e a pesquisa histológica é realizada aos 7, 14, 28 e 56 dias. Observam uma melhor resposta tecidual nos implantes revestidos por hidroxiapatita.

RABIE *et al.* (1996) estudam a regeneração óssea em coelhos (região craniana), no uso de enxerto ósseo endocondral e matriz óssea desmineralizada. Os melhores resultados foram demonstrados pelo grupo em que se usou enxerto ósseo e matriz desmineralizada (47% maior do que enxerto ósseo endocondral somente). Em duas semanas, a regeneração tecidual se expressou por um estágio intermediário de cartilagem.

CHIHARA & SUGIMOTO (1997) procuram elucidar os mecanismos através dos quais o GH age sobre o metabolismo ósseo. Os autores observam um aumento na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), um aumento na atividade da fosfatase alcalina e um efeito cooperativo na expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do procolágeno tipo I, bem como a síntese do colágeno. Os achados destes autores indicam que o GH age diretamente sobre os osteoblastos para a formação de osso, e que estimula a reabsorção, através de ação direta e indireta na maturação de células precursoras de osteoclastos, além de estimular a produção local de fatores de crescimento IGF-I e proteína óssea - 5 (BP - 5), envolvidos na estimulação do remodelamento.

GORDH *et al.* (1997) estudam enxertos ósseos autógenos em 22 ratos adultos, e observam melhor resposta regenerativa local onde a cortical óssea do defeito (receptor) é perfurada, e o enxerto (doador) é colocado com a sua porção cortical voltada para o defeito ósseo, permitindo assim a migração celular em direção ao enxerto.

RODRIGUEZ *et al.* (1997) pesquisam os efeitos de biomateriais empregados em defeitos de 3mm, em tíbias de ratos. Observam melhores resultados após utilização de osso desmineralizado.

COLLIGNON *et al.* (1997) relatam a utilização de células embrionárias ósseas de ovelha em cultura, com a finalidade de obterem informações sobre a regulação

endócrina da atividade de osteoblastos, e desenvolverem um modelo de estudo da função osteoblástica em mamíferos maiores.

NAAMAN & OUHAYOUN (1998) testam os efeitos do esqueleto de coral natural com acréscimo ou não de um polímero protetor (*polyglactin* 910). Após 28 dias, os autores observam em defeitos ósseos cranianos de ratos, que a melhor resposta do tecido frente ao uso de partículas do esqueleto de coral é obtida com a associação do *polyglactin* 910.

KIM *et al.* (1998) estudam a implantação de matriz óssea cortical desmineralizada em defeitos cirúrgicos na região dento-alveolar de cães. Os resultados obtidos pelos pesquisadores sugerem que o enxerto dá condições para regeneração cementária, mas com regeneração óssea imprevisível.

BOSH *et al.* (1998) demonstram que defeitos cranianos ósseos da ordem de 5mm (*full-thickness*), em ratos de 5 a 6 meses de idade, são considerados de tamanho crítico, ou seja, a partir daí não há regeneração óssea espontânea, no período de 6 a 12 meses.

BARETTA *et al.* (1998) estudam os efeitos osteogênicos da matriz óssea desmineralizada em defeitos ósseos de origem exodôntica em cães. Estes autores demonstram que a matriz óssea desmineralizada não leva à rejeição tecidual e acelera o reparo ósseo.

EDWARDS *et al.* (1998) estudam os efeitos da matriz óssea desmineralizada humana em ratos. Os enxertos são colocados em sítios subcutâneos e intramusculares, e são monitorados em um período de 1 ano. O potencial osteoindutor do osso desmineralizado é observado.

OHLSSON *et al.* (1998) numa revisão sobre o hormônio do crescimento (GH) e o metabolismo ósseo, relatam que o tratamento de pacientes com GH deve ser realizado em longo prazo (18 meses) para que se tenha um aumento de massa óssea. Descrevem também, que ratos normais tratados com GH ganham massa óssea e força mecânica total óssea. Os autores sugerem que devido ao alto custo do tratamento hormonal, fatores liberadores de hormônio devem ser utilizados, tendo como vantagem a possibilidade de administração oral de alguns deles, e a indução fisiológica da secreção do hormônio.

WIKESJO *et al.* (1999) estudam os efeitos de um recombinante humano da proteína morfogênica de osso 2 (rhBMP-2) sobre a reabsorção radicular e anquilose de dentes de cães, observando uma provável correlação.

MACNEILL *et al.* (1999) estudam a aplicação de substâncias osteopromotoras como a hidroxiapatita, o sulfato de cálcio associado ao osso autógeno e a biocerâmica com partículas de 2 tamanhos diferentes em defeitos ósseos em coelhos. Os animais são sacrificados após 28 dias e cortes histológicos da região são analisados por imagem computadorizada, para cálculo de porcentagem de área de superfície de osso neoformado. Resultados obtidos revelam que estas substâncias podem auxiliar na formação óssea, com destaque para o sulfato de cálcio associado ao osso autógeno.

Segundo SERVICE (2000), estudos americanos e europeus têm focalizado biomateriais recobertos por sinais moleculares, responsáveis por ativar mecanismos de reparo do próprio organismo. De acordo com informações relatadas anteriormente sobre o cultivo de células progenitoras ósseas, este autor também relata que tais estudos têm a finalidade de proporcionar condições de transplante celular para locais danificados. Além disso, através da terapia gênica, existem estudos de inserção de genes nas células, que codificam proteínas essenciais do reparo ósseo.

MUELLER & RICHARDS (2004) descrevem a identificação imunohistoquímica de moléculas presentes na membrana celular de osteócitos de osso humano, bovino e ovino, responsáveis pela diferenciação final dos osteoclastos - células que possuem a função de absorção durante o remodelamento ósseo. Destes achados os autores descrevem o envolvimento de osteoblastos e osteócitos como participantes ativos no remodelamento tecidual, informação que pode auxiliar no desenvolvimento de biomateriais com ação celular específica.

RHODES *et al.* (2004) descrevem a utilização de 28 ovelhas, com idades de 4 meses a 8 anos, em experimentação com células de medula óssea, mais especificamente células-tronco mesenquimais, com aplicação na engenharia de tecidos.

LES *et al.* (2004) utilizam um modelo ovino e relatam que a falta de estrógeno afeta negativamente as propriedades viscoelásticas do osso, devido a algum componente não-mineral existente no tecido, que deve ser significativamente alterado na ausência de remodelamento secundário.

SWENNEN *et al.* (2005) demonstram um modelo de estudo da distração óssea em defeitos cranianos de 16 ovelhas, através de dados coletados em tomografia computadorizada 3D comparados aos dados de tomografia convencional.

Baseado nas informações anteriores e de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética do Centro Universitário Positivo, o seguinte protocolo experimental foi seguido: um biomaterial osteopromotor foi preparado com duas diferentes técnicas de esterilização; um defeito ósseo na região mandibular de ratos foi produzido; o biomaterial foi inserido e recoberto apenas com o tecido periodontal; os animais foram sacrificados em dois períodos diferentes; e o reparo foi analisado através de técnicas microscópicas, conforme descrito em detalhes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E ESTUDO EXPLORATÓRIO DO PREPARO DE BIOMATERIAIS

O biomaterial ovino (S) foi obtido a partir do osso mandibular de uma ovelha (*Hampshire down*) com 6 meses de idade, proveniente do criadouro Cabanha Gralha Azul, localizado na região da Colônia Witmarsun, aproximadamente 60 km de Curitiba, Paraná. O animal foi abatido para fins alimentícios por funcionário do estabelecimento, sendo a cabeça descartada. A mandíbula do animal foi descarnada, dividida ao meio, e levada ao refrigerador (-12°C) pelo mesmo funcionário. Depois, devidamente acondicionado em caixa com gelo, o fragmento ósseo (uma hemi-mandíbula) foi levado até o laboratório, no qual teve sua superfície devidamente limpa através da remoção de tecidos moles residuais (periósteo e inserções musculares), por ação de raspagem com bisturi de orban (DUFLEX, Brasil). Após, o fragmento ósseo foi lavado em água corrente, seguindo a uma imersão em solução alcoólica 70% por 5 segundos (BIOTEC, Brasil). Novamente foi armazenado (-12°C) (KIERNAN, 1981).

Para obtenção de partículas pequenas, fora do refrigerador, a superfície da hemi-mandíbula foi desgastada com broca (10 mm, IRWIN, Brasil) por ação rotacional produzida com furadeira elétrica (SKIL, Brasil), de modo a produzir pequenos fragmentos que foram coletados e devidamente armazenados (-12°C) (Fig. 1).

FIGURA 1: AÇÃO DA BROCA SOBRE MANDÍBULA OVINA



Os fragmentos de vários tamanhos foram devidamente separados com peneiras (BERTEL n. 20 e 40, ABNT/ASTM , 20 mesh > 0,850 mm e 35 mesh > 0,425 mm, Brasil) em aparelho magnético (BERTEL - 12.03, Brasil), com vibração em 10/10 por 5 min. Após a separação, os fragmentos foram colocados em embalagem de polietileno, e armazenados a -12°C .

Obteve-se partículas de diâmetros menores que 0,425 mm (S1), maiores que 0,850 mm (S3) e entre essas grandezas (S2). O tipo S2 (entre 0,425 a 0,850 mm) foi utilizado nos ensaios microscópicos e biológicos (tamanho similar ao de partículas comerciais: Osteopur® = 450-850 μm).

Alternativamente, dois biomateriais comerciais, o osso bovino liofilizado desproteinado (denominado L) e a biocerâmica, β -trifosfato de cálcio, (denominado B) também foram utilizados.

Parte das partículas dos biomateriais B e L foram metalizadas (SCD 030, BALZERS UNION, Alemanha) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (SEM 505, PHILLIPS, Holanda). As imagens obtidas foram comparadas com aquelas obtidas das partículas S2 em outro eletromicroscópio (JSM 6360-LV, JEOL, Japão). Após o período de monitoramento, o tamanho das partículas foi aferido a partir do

microscópio de luz (021/3 QUIMIS, Brasil). A metodologia de análise das imagens foi a mesma descrita no item 3.6 ANÁLISE DAS IMAGENS.

Uma parte do lote S2 (5g) foi esterilizado em autoclave (Sa) (CRISTÓFOLI, Brasil), submetendo as partículas a uma desnaturação das proteínas por aumento da temperatura. Enquanto a outra parte (5g) foi esterilizada com óxido de etileno (Se) (MIRAX, Brasil), e, portanto, sem a influência da temperatura, evitando a inativação protéica.

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Um estudo piloto prévio foi realizado com três animais para teste de biossegurança e condições de manutenção e manipulação dos animais no biotério. O comportamento pós-cirúrgico dos animais, a estabilidade do biomaterial (biocerâmica) no local de enxerto e o estado de saúde bucal e corporal foram avaliados.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em um total de 96 animais (*Rattus norvegicus*, WISTAR) por um único operador. A Tabela 1 mostra os grupos de animais do experimento: um total de seis grupos. Devido à viabilidade técnica, a fase cirúrgica foi executada em etapas distintas:

1ª) Grupos I e II com $n = 5$ (ZAHEDI *et al.*, 1998). Neste período, havia disponíveis apenas os biomateriais comerciais e estava sendo desenvolvido o biomaterial protótipo. Ainda, a técnica de microscopia eletrônica de varredura era a única disponível.

2ª) Grupos III e IV com $n = 3$ (BARTEE & CARR, 1995). Nesta fase, havia todos biomateriais e a técnica de microscopia de luz estava disponível.

3ª) Grupos V e VI com $n = 5$. A análise comparativa dos biomateriais desenvolvidos foi realizada em relação à primeira etapa.

Após a parte cirúrgica, os Grupos I (20 animais), III (18 animais) e V (10 animais) foram monitorados durante uma semana, enquanto os Grupos II (20 animais), IV (18 animais) e VI (10 animais) foram monitorados por três semanas.

TABELA 1 - DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo	Animais	Biomaterial	Eutanásia (semanas)	Análise
GI	01-05 (1-5)	C	1	MEV
	06-10 (1-5)	B		
	11-15 (1-5)	L		
	16-20 (1-5)	BL ⁽¹⁾		
GII	01-05 (1-5)	C	3	MEV
	06-10 (1-5)	B		
	11-15 (1-5)	L		
	16-20 (1-5)	BL		
GIII	1-3 (1-3)	C	1	ML
	4-6 (1-3)	B		
	7-9 (1-3)	L		
	10-12 (1-3)	BL		
	13-15 (1-3)	Sa		
	16-18 (1-3)	Se		
GIV	1-3 (1-3)	C	3	ML
	4-6 (1-3)	B		
	7-9 (1-3)	L		
	10-12 (1-3)	BL		
	13-15 (1-3)	Sa		
	16-18 (1-3)	Se		
GV	a) 01-05 (1-5)	As	1	MEV
	b) 06-10 (1-5)	Se		
GVI	a)01-05 (1-5)	As	3	MEV
	b)06-10 (1-5)	Se		

(C) Controle. (B) Biocerâmica, β -trifosfato de cálcio® (EINCO, Brasil). (L) Osso bovino liofilizado desproteinado® (VIANFARM, Brasil). (BL) Biocerâmica + Osso liofilizado desproteinado. (Sa) Osso ovino autoclavado. (Se) Osso ovino esterilizado por óxido de etileno. ⁽¹⁾ Mistura em volumes iguais.

Todos os cuidados necessários para o controle de infecção foram devidamente tomados, tais como: desinfecção de equipamentos e esterilização de instrumentais em autoclave. Assim, os seguintes procedimentos foram executados:

- 1) Após sedação com éter etílico (MERCK, Brasil), o animal foi devidamente pesado em balança (BEL MARK 500, QUIMIS, Brasil).
- 2) E anestesiado (IP) com ketamina (40mg/kg) (BAYER, Brasil) e xylazina (5mg/kg) (BAYER, Brasil) (WIXSON *et al.*, 1987; FLECKNELL, 1996).
- 3) O animal foi posicionado na mesa cirúrgica (ZIELAK² *et al.*, 2000) (Fig. 2).
- 4) Uma incisão linear (aproximadamente 0,8mm) na mandíbula direita, região vestibular anterior ao forame mentoniano, foi feita com um bisturi (DUFLEX, Brasil) contendo uma lâmina adequada (15, BD, Brasil), com o cuidado de não romper o colarinho cervical (BOSCH *et al.*, 1998).
- 5) Os tecidos moles foram afastados e apreendidos com dispositivos da mesa cirúrgica.
- 6) O defeito ósseo foi criado por ação de broca esférica (BOHNING *et al.*, 1999) multilaminada *carbide* (ANTÍLOPE, Suíça) de 3 mm de diâmetro, com aparelho portátil em baixa rotação (DENTEC - 405N, Brasil). O procedimento foi realizado com irrigação abundante de solução fisiológica (JP, Brasil) para evitar o superaquecimento de tecidos vivos (BOSCH *et al.*, 1998).
- 7) A irrigação e limpeza do local com gaze estéril (TELAMED, Brasil) permitiram uma boa visualização da superfície radicular do incisivo inferior, que foi definida como o limite interno da lesão artificial. Limites laterais foram definidos pelo diâmetro da broca (Fig. 3).
- 8) O tipo de biomaterial introduzido no defeito ósseo seguiu o itinerário definido na Tabela 1.
- 9) Os tecidos moles foram re-posicionados e suturados (dois pontos descontínuos) com seda 4-0 (JOHNSSON & JOHNSSON, Brasil) (BOSCH *et al.*, 1998). O mesmo procedimento foi realizado com os animais de controle, exceto a aplicação de biomaterial.

- 10) Buprenorfina (0.1-0.25 mg/kg, PO, BID a TID)(SHERING-PLOUGH, E.U.A.) foi administrada ao animal para diminuição da dor até 24 horas após a cirurgia (FLECKNELL, 1991).
- 11) O animal foi mantido em gaiola plástica e recebeu alimentação normal e água até a data prevista para a eutanásia (FOX *et al.*, 1984).
- 12) A eutanásia dos animais aconteceu a uma e três semanas (ZAHEDI *et al.*, 1998; BOHNING *et al.*, 1999), conforme Tabela 1. Os animais foram pesados imediatamente depois da eutanásia.

FIGURA 2 – MESA CIRÚRGICA



FIGURA 3 - LESÃO ÓSSEA ARTIFICIAL



3.3 COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

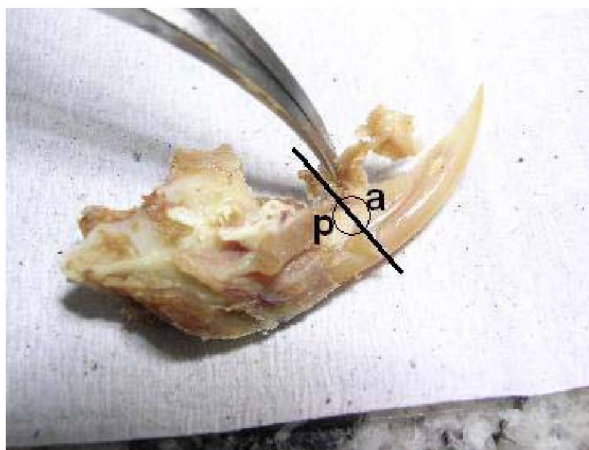
As hemi-mandíbulas com os defeitos enxertados foram coletadas e fixadas em uma solução preparada com 0,03% glutaraldeído (MERCK, Alemanha) em tampão 0,1M cacodilato de sódio (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, E.U.A.) por 48 horas (KIERNAN, 1981; BARTEE & CARR, 1995). Depois da remoção dos tecidos superficiais (pelos, pele e parte da mucosa oral), as amostras seguiram as diferentes técnicas para as análises posteriores (ML ou MEV, Tab. 1).

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Antes de ser levada ao microscópio, um único operador realizou uma incisão transversal na região mediana do defeito, dividindo o tecido cicatricial em duas partes: anterior e posterior. A parte anterior foi pinçada e removida pelo mesmo operador, a fim de que as regiões internas do enxerto pudessem ser observadas em MEV (Fig. 4). As amostras foram montadas em suportes específicos para os diferentes microscópios usados e levadas ao metalizador. Devido à viabilidade técnica, três diferentes

microscópios foram utilizados na obtenção das imagens (SEM 505 e XL30, PHILLIPS, Holanda; JSM 6360-LV, JEOL, Japão).

FIGURA 4 - PINÇAGEM DE TECIDO CICATRICIAL SUPERFICIAL DA REGIÃO DO ENXERTO



(linha reta) Direção da incisão transversal no tecido cicatricial. (círculo) Região do enxerto. (a) Parte anterior. (p) Parte posterior

3.5 MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Após a fixação, as amostras destinadas à microscopia de luz foram lavadas em água corrente e colocadas em tubos de incubação (Fig. 5) contendo solução quelante para descalcificação (KIERNAN, 1981): EDTA (LABSYNTH, Brasil, 60g/900 ml água destilada), pH 6.4 (ajustado com NaOH sólido, LABSYNTH, Brasil), a aproximadamente 37°C, em mesa agitadora (WCJ-802, PH CIENTIFICA, Brasil) acoplada ao pHmetro (ONDA, Brasil). O tempo de descalcificação foi de aproximadamente 5 dias.

FIGURA 5 - SOLUÇÃO QUELANTE EM MESA AGITADORA E PHMETRO



Após a descalcificação, as peças foram devidamente levadas ao banho histotécnico (893 ANCAP, Brasil). Depois da parafinização, os procedimentos de emblocagem foram executados. Os blocos de parafina foram levados ao micrótomo (CUT 5062 SLEE MAINZ, Alemanha) com a finalidade de se obter cortes da ordem de 5 a 7 μm de espessura; lâminas descartáveis foram usadas (VER-NBP, Brasil). Em todas as amostras foram feitos cortes seriados, transversalmente ao incisivo e região de enxerto, desde o início do aparecimento do defeito até o seu final, estabelecendo limites e região mediana da lesão artificial. Os cortes foram distendidos em banho histológico (ANCAP, Brasil) e extendidos em lâminas de vidro (PERFECTA, Brasil). As lâminas com os cortes foram levadas à estufa (ODONTOBRÁS, Brasil) por 2 horas para secagem. As lâminas secas passaram pelo protocolo convencional de coloração para H.E. (LABSYNTH, Brasil), para finalmente serem montadas com Entellan (MERCK, Alemanha) e lamínula (PERFECTA, Brasil) (KIERNAN, 1981).

3.6 ANÁLISE DAS IMAGENS

3.6.1 Imagens obtidas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os parâmetros histomorfométricos foram analisados com auxílio de um programa de análise de imagens (*Image Tool 2.00*, UTHSCSA - Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas, E.U.A.). Foram utilizados como parâmetros alguns aspectos tais como tamanho de partículas dos biomateriais no pré-cirúrgico, áreas de exposição da superfície radicular (provocada pelo pinçamento do tecido periodontal sobre a lesão), estruturas filiformes (estruturas únicas consideradas fibras, e em grupo consideradas feixes), e áreas com glóbulos presentes na superfície (regiões de semelhança com glóbulos mineralizados *in vitro* por MEV, MATSUZAKA *et al.*, 1999) (Tabela 2).

TABELA 2 – PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS OBTIDOS POR MEV E ANALISADOS PELO PROGRAMA *IMAGE TOOL 2.00*

Parâmetro	Image Tool 2.00 – Dispositivo de análise
Tamanho de partícula	Área
Exposição radicular	Área
Estruturas filiformes	Distância = diâmetro
Glóbulos de superfície	Área

A delimitação da área com glóbulos foi realizada manualmente com caneta para retroprojektor (PILOT, Brasil) sobre um filme plástico colocado em cima das eletromicrografias. Esta delimitação (seleção de áreas) foi posteriormente digitalizada com *scanner* (BRIGHT, China), bem como todas as outras imagens que foram reveladas em papel fotográfico, provenientes dos eletromicroscópios SEM 505 e XL30. Nas imagens originalmente digitais (JSM 6360-LV), a delimitação foi feita através do ícone **pincel** no programa *Paint* (MICROSOFT, E.U.A.) na cor preta ou branca. Essa

escolha dependeu de qual das cores oferecia maior contraste com o panorama geral da eletromicrografia.

Para o cálculo da área de exposição radicular, as fotomicrografias receberam a marcação em preto (ícone **pincel**, *Paint*) para delimitar as áreas de defeito expostas, e em branco para delimitar as áreas de exposição da superfície radicular do incisivo inferior.

No programa *Image Tool* 2.00, após o arquivo da imagem estar aberto, o 1º passo era o de informar o padrão de escala da foto ao programa: ícones **settings**, e depois **calibrate spatial measurements**. Após a seleção de fibras ou feixes a serem medidos na imagem, parâmetros como distâncias (ícone **distance**) para cálculo das espessuras podiam ser obtidos (janela **results**). Para cálculo das áreas de exposição radicular e/ou defeito o ícone **area** era selecionado e aplicado.

Com as imagens digitalizadas das áreas com glóbulos abertas selecionava-se, primeiramente, o ícone **processing** e **color-to-gray-scale**. Logo em seguida: **settings**, e depois **calibrate spatial measurements**. Depois **analysis**, então **object analysis**, e **find objects**, **manual**, e **OK**. A seguir, aparecia um quadro com dois cursores abaixo de um gráfico; o cursor da direita deveria ser movido com o *mouse* até que as áreas selecionadas aparecessem todas em vermelho; por último: **OK**. Novamente pressionava-se **analysis**, **object analysis** e **analysis**.

A mensuração de tamanho de partículas (área) dos biomateriais encontradas nas amostras após o tempo de monitoramento (1 e 3 semanas), também foi realizada a partir das fotomicroscopias obtidas com a microscopia de luz.

3.6.2 Imagens obtidas em Microscopia de Luz (ML)

As lâminas coradas foram observadas em microscópio de luz (021/3 QUIMIS, Brasil), acoplado à câmera (SDC-310, SAMSUNG, Coréia) para obtenção de imagens digitais. Imagens da câmara de Neubauer (IMPROVED NEUBAUER, BOECO, Alemanha) foram obtidas com a finalidade de estabelecer uma graduação para as imagens das amostras. No programa *Paint* as escalas foram estabelecidas, ou seja,

com o ícone **pincel** acionado o tamanho das barras foi determinado a partir do quadriculado visualizado na câmara, para cada aumento. Baseado neste princípio, foi estabelecido a escala de 0.2mm para 40X, e 50µm para 100X e 400X. Uma legenda com barras e valores correspondentes foi adicionada às imagens obtidas das amostras, nos respectivos aumentos.

No *IMAGE TOOL 2.00*, as imagens de ML foram analisadas da mesma forma que aquelas obtidas por varredura. PARÂMETROS como DIÂMETRO DE DEFEITO (DISPOSITIVO = DISTÂNCIA) E TAMANHO DE PARTÍCULAS (DISPOSITIVO = ÁREA) foram avaliados. Toda a histomorfometria computadorizada foi realizada por um único operador.

Além da histomorfometria, todas as imagens foram qualitativamente analisadas em relação a: tipo de infiltrado inflamatório, proliferação celular, avaliação do desenvolvimento ósseo e neovascularização. A Tabela 3 mostra a classificação utilizada na calibração de dois observadores, responsáveis pela análise destes parâmetros qualitativos.

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES BIOLÓGICAS A PARTIR DA MICROSCOPIA DE LUZ (ROBBINS *et al.*, 2001; CORRÊA, 2005)

Classificação	Descrição Tecidual
Inflamação Aguda (IA)	Predominância de polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos), presença de edema.
Inflamação Crônica (IC)	Predominância de mononucleares (linfócitos, plasmócitos, macrófagos), início de angiogênese e aumento na fibrinogênese.
Inflamação Crônica Granulomatosa – Células de Langhans (ICG-CL)	Predominância de mononucleares (linfócitos, plasmócitos, macrófagos), intensa angiogênese, intensa proliferação fibroblástica, predominância de células de Langhans.
Inflamação Crônica Granulomatosa – Corpo Estranho (ICG-CE)	Predominância de mononucleares (linfócitos, plasmócitos, macrófagos), intensa angiogênese, intensa proliferação fibroblástica, predominância de células de corpo estranho.
Reparo Cicatricial (RC)	Tecido de preenchimento, com presença de osteóide (osso imaturo).
Reparo Tecidual (RT)	Presença de formação óssea compacta (osso maduro).

4 RESULTADOS

O estudo piloto para treinamento de manipulação cirúrgica de biomateriais e manutenção de animais revelou um desempenho adequado da metodologia citada. Os animais foram facilmente manipulados e não apresentaram comportamento de irritabilidade. Nenhum animal faleceu. O biomaterial permaneceu no sítio do enxerto e não foi verificada perda do biomaterial no sítio de inserção ou infecção local, bem como problemas relacionados à sutura.

4.1 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE OSSO OVINO

A partir da metodologia proposta, foram obtidas partículas de osso ovino com tamanhos adequados para o enxerto experimental, similarmente ao encontrado em produtos comerciais. A Figura 6 mostra o aspecto macroscópico das partículas produzidas pela técnica (S1, S2 e S3). As partículas S2 (entre 0,425 e 0,850 mm) foram escolhidas para os testes *in vivo*.

FIGURA 6 - DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS DO OSSO OVINO (S)



4.1.1 Comparação das partículas de biomateriais por MEV antes do ato cirúrgico

O tamanho das partículas foi avaliado através das áreas observadas por MEV. A análise preliminar das partículas (Tab. 4) demonstrou que havia uma variação muito grande de tamanho de partículas (áreas), principalmente as de osso bovino liofilizado comercial (L), que variavam de $0,01 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ a $1,79 \text{ mm}^2$. Enquanto que o tamanho das partículas de biocerâmica (B) e de osso ovino tipo 2 (S2) eram mais homogêneos, sendo que as partículas de B eram menores, ocupando áreas de $0,01 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ a $0,12 \text{ mm}^2$, e as partículas de S2 apresentaram tamanhos intermediários, variando de $1,27 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ a $0,61 \text{ mm}^2$.

4.1.2 Comparação das partículas de biomateriais por ML após a inserção e osteopromoção

Após o período de monitoramento dos enxertos (Tab. 5), as maiores partículas visualizadas em microscopia de luz (ML) foram as de biocerâmica 1 semana ($1B = 1,46 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$), enquanto as menores foram as de osso bovino liofilizado, tanto na semana 1 quanto na 3 ($1L$ e $3L = 0,08 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$). Por outro lado, as partículas de osso ovino atingiram o padrão obtido pelo osso bovino somente na semana 3 ($Se = 0,09 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ e $Sa = 0,08 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$).

TABELA 4 – AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DE BIOMATERIAIS NO PRÉ-CIRÚRGICO POR MEV

Biomaterial	Tamanho de partículas (área), $\text{mm}^2 \times 10^{-4}$	
	Máximo	Mínimo
L	1200 – 17900	0,01 – 0,08
S2	2700 – 6100	1,27 – 3,31
B	700 – 1200	0,01 – 0,08

(L) Osso bovino liofilizado comercial®. (S2) Osso ovino tipo 2. (B) Biocerâmica®.

TABELA 5 - TAMANHO MÁXIMO DE PARTÍCULAS APÓS OSTEOPROMOÇÃO (ML)

Amostra	Tamanho de partículas (área), $\text{mm}^2 \times 10^{-4}$	
	1 semana	3 semanas
B	1,46	1,04
L	0,08	0,08
BL	B = 0,53 / L = 0,24	B = 0,91 / L = 0,09
Se	0,40	0,09
As	0,48	0,08

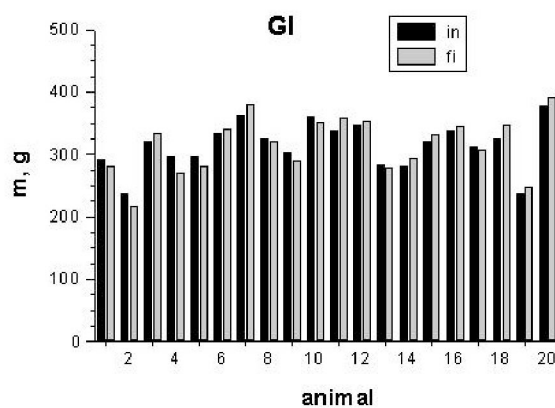
(B) Biocerâmica. (L) Osso bovino liofilizado comercial. (BL) Biocerâmica + Osso liofilizado comercial. (Sa) Osso ovino autoclavado. (Se) Osso ovino esterilizado por óxido de etileno.

4.2 MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS DOS ANIMAIS

4.2.1 Grupos I e II (C, B, L, BL; 1 e 3 semanas)

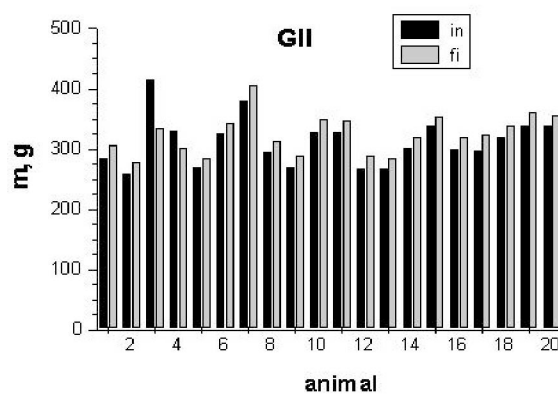
O monitoramento das massas corporais dos animais não demonstrou diferenças significantes entre o início do experimento (pré-cirúrgico) e imediatamente depois da eutanásia para os Grupos I e II (nas Figuras 7 e 8: eixo x = animais numerados de 1 a 20, e eixo y = massa em gramas). Em GI, os animais tiveram massa inicial média de 315,2g e massa final de 317g, o que foi praticamente o mesmo valor. Esta diferença foi um pouco maior em GII, pois a massa inicial media foi de 312,8g e a final de 325,4g. Assim, o aumento na massa media global em GI (1,8g ou 0,6%) foi levemente menor que em GII (12,6g ou 4,0%), embora a grandeza possa ser considerada a mesma. GI também apresentou o desvio padrão (14,3g) menor que o observado para o GII (27g). O animal 3 de GII (Fig. 8) demonstrou uma grande alteração de massa, embora nenhum sinal patológico da área de enxerto foi verificado, bem como algum sinal patológico geral ou perturbação de comportamento do animal. A variação de massa dos animais restantes de GII foi semelhante à de GI, e nenhuma indicação de infecção foi registrada.

FIGURA 7 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO I, UMA SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM B, L, BL OU C



(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

FIGURA 8 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO II, TRÊS SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM B, L, BL OU C



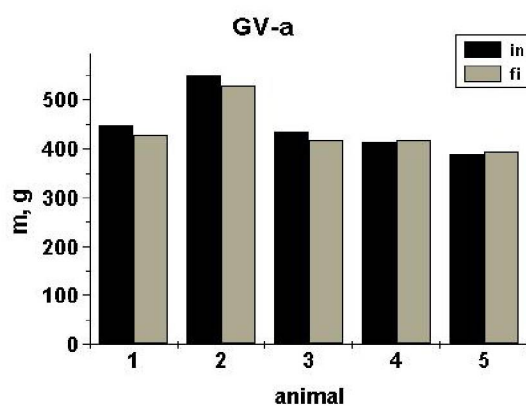
(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

4.2.2 Grupos V e VI (Sa e Se; 1 e 3 semanas)

O monitoramento das massas corporais nestes grupos demonstrou diferenças maiores do que as observadas para os grupos I e II. Em GV-a (animais que receberam osso ovino autoclavado, Sa, 1 semana) a massa inicial média foi de 448g e a massa final média foi de 437,8g. Assim, ocorreu uma perda média de 10,2g ou 2,3% de massa por animal (Fig. 9). Por outro lado, os animais que receberam o osso ovino esterilizado com óxido de etileno (Se, GV-b, 1 semana) tinham uma massa inicial média de 342,8g e passaram a ter uma massa final média de 376,2g, ou seja, um ganho de 33,4 g ou 9,7% por animal (Fig. 10). O grupo GV-a apresentou um desvio padrão de 7,2g, e GV-b apresentou um desvio padrão de 23,6g.

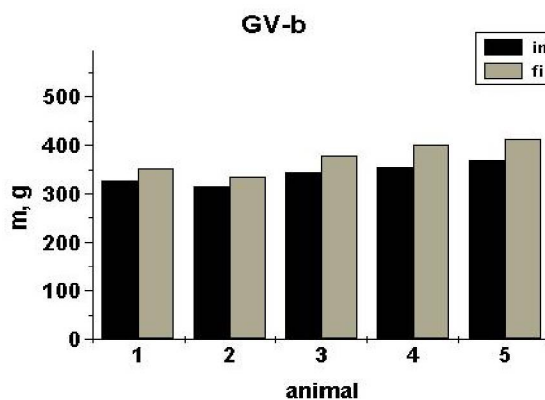
Os animais do Grupo VI-a (osso ovino autoclavado, 3 semanas) tiveram uma massa inicial média de 404,6g e massa final média de 392,4g, ou seja, uma perda de 12,2g ou 3,0% de massa por animal (Fig. 11). Neste mesmo grupo, os animais que receberam o osso ovino esterilizado com óxido de etileno (Se, GVI-b) apresentaram uma massa inicial média de 384,6g e a massa final média de 382,2g, o que representou uma perda de 2,4g ou 0,6% por animal (Fig. 12). Os desvios padrões dos respectivos grupos foram: 8,6g para GVI-a e 1,7g para GVI-b. A ordem de massa perdida foi baixa para os dois biomateriais testados com os animais desse grupo.

FIGURA 9 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO V-a, UMA SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM Sa



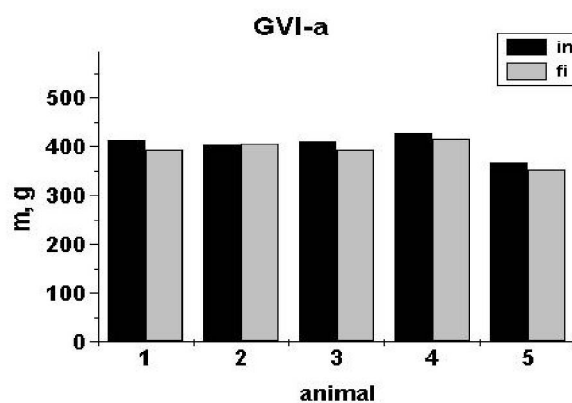
(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

FIGURA 10 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO V-b, UMA SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO COM Se



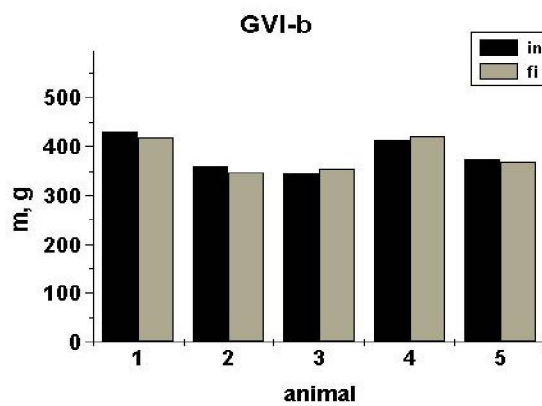
(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

FIGURA 11 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO VI-a, TRÊS SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM Sa



(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

FIGURA 12 - MONITORAMENTO DAS MASSAS CORPORAIS NO GRUPO VI-b, TRÊS SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO COM Se



(in) Massa corporal inicial. (fi) Massa corporal final.

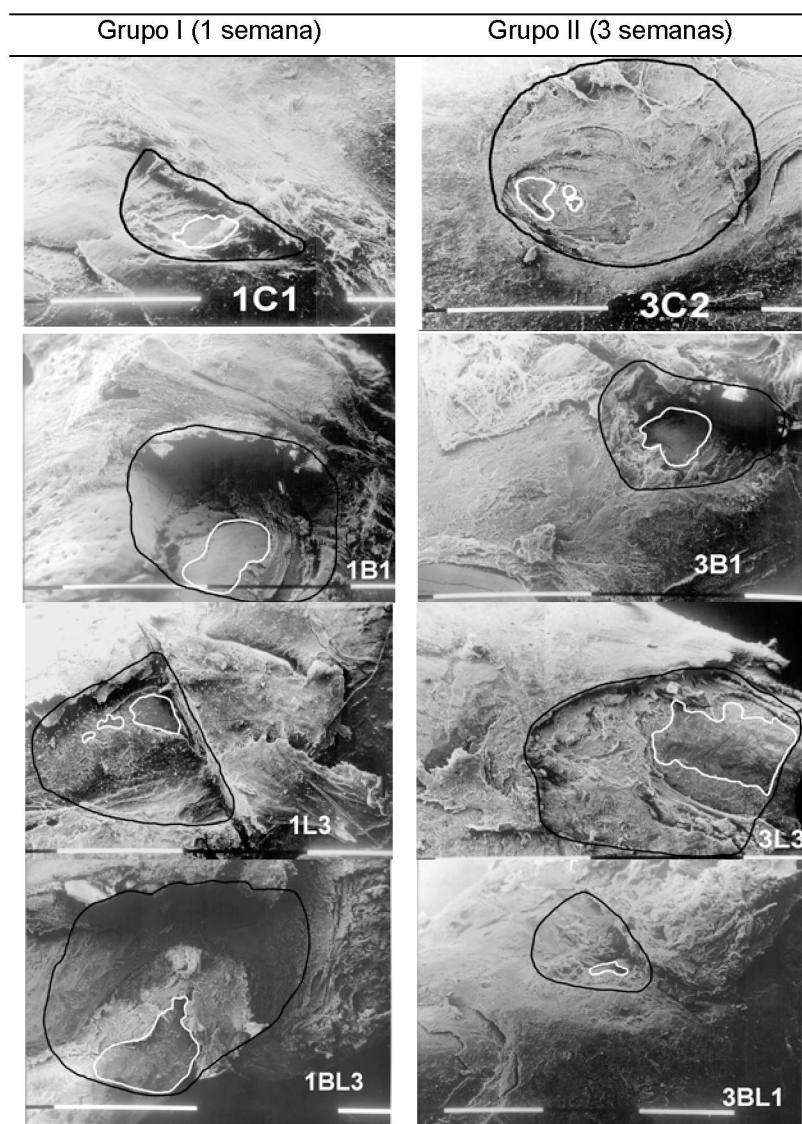
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.3.1 Grupos I e II (C, B, L, BL; 1 e 3 semanas)

4.3.1.1 Exposição Radicular

O grau de exposição radicular foi avaliado entre as amostras dos Grupos I e II (Fig. 13 e Tab. 6). Na Figura 13, a linha preta representa a área de defeito exposta, enquanto a linha branca representa a área de exposição radicular. A Tabela 6 foi elaborada a partir dos valores obtidos com o programa de análise de imagens. O desvio padrão global para a exposição radicular foi 2,04%. Embora este valor possa parecer relativamente alto, é suficiente para afirmarmos que somente C e BL tiveram importantes áreas de exposição radicular (1C = 11.47% e 3C = 3.14%; 1BL = 12.50% e 3BL = 3.40%). Também foi possível observar na Figura 13 que no uso dos biomateriais o volume tecidual foi maior do que em amostras controle.

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR NOS GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS)



(linha preta) Área de exposição do defeito. (linha branca) Área de exposição radicular. (NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplo: (1C1) 1 semana do controle, animal 1; B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial; BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial.

TABELA 6 - VALORES (%) DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR EM RELAÇÃO À ÁREA DE DEFEITO, GRUPOS I E II (C, B, L E BL; 1 E 3 SEMANAS)

Amostra	Área de defeito exposta (mm ²), preto	Área de exposição radicular (mm ²),branco	Exposição (%)
1C1	0,61	0,07	11,47
1B1	1,54	0,19	12,33
1L3	1,46	0,09	6,16
1BL3	2,08	0,26	12,50
3C2	1,91	0,06	3,14
3B1	0,73	0,11	15,06
3L3	1,84	0,37	20,10
3BL1	0,88	0,03	3,40

(NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplo: (1C1) 1 semana do controle, animal 1; B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial, BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial.

4.3.1.2 Diâmetro de Fibras e Feixes

A Tabela 7 exhibe o diâmetro de fibras e feixes, selecionados de todas as eletromicrografias que apresentaram estruturas filiformes. As estruturas filiformes únicas com diâmetros mais baixos foram consideradas como fibras, as quais atingiram valores médios que variaram de 0,07 a 0,18 μm , com exceção de 1L, que apresentou diâmetro mais baixo de 0,40 μm . Por outro lado, os grupos de estruturas filiformes (ou conjunto de fibras) com diâmetros mais altos foram considerados como feixes, os quais tiveram uma grande variação de espessura (de 5,37 μm para 1BL a 55,82 μm para 1C). Os valores mais altos foram observados para controles (1C = 55,82 μm e 3C = 49,14 μm), enquanto os mais baixos foram observados para BL (1BL = 5,37 μm e 3BL = 5,62 μm).

TABELA 7 - DIÂMETRO DE FIBRAS E FEIXES AVALIADOS POR MEV, GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS)

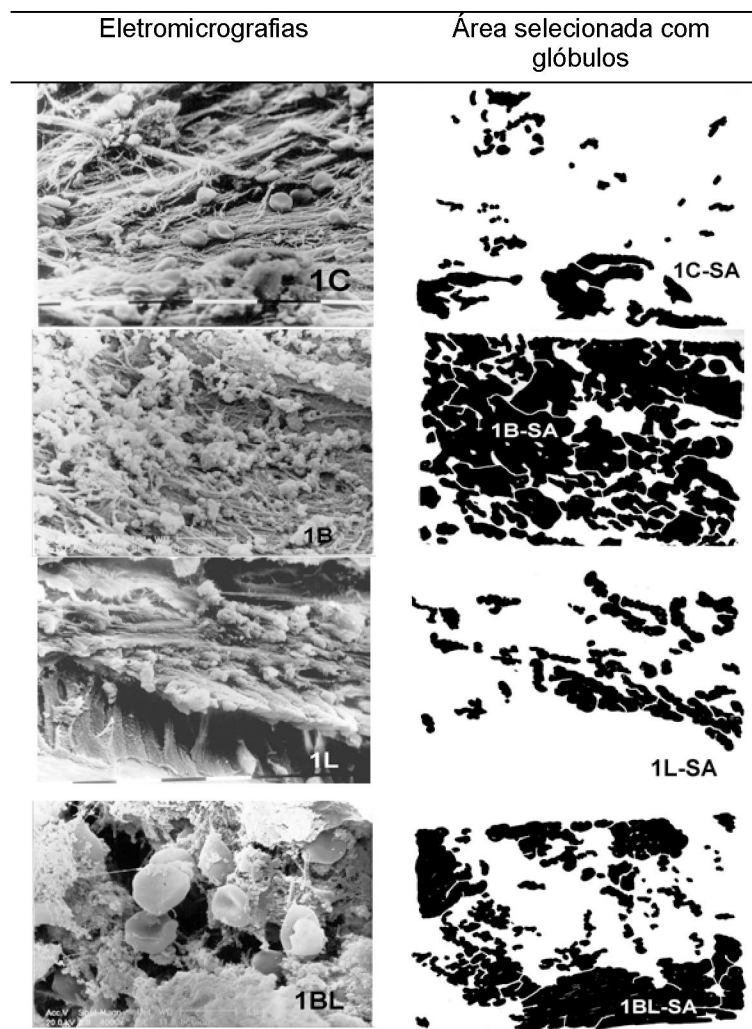
Amostras*	Diâmetro, μm	
	Mínimo (fibra)	Máximo (feixe)
1C	0,07	55,82
1B	0,15	28,56
1L	0,40	13,01
1BL	0,18	5,37
3C	0,07	49,14
3B	0,18	19,57
3L	0,13	17,59
3BL	0,13	5,62

(Nx) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra. Exemplo: (1C) 1 semana do controle; C = controle, B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial, BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial. * Eletromicrografias de todas as amostras com estruturas filiformes.

4.3.1.3 Área com Glóbulos de provável mineralização

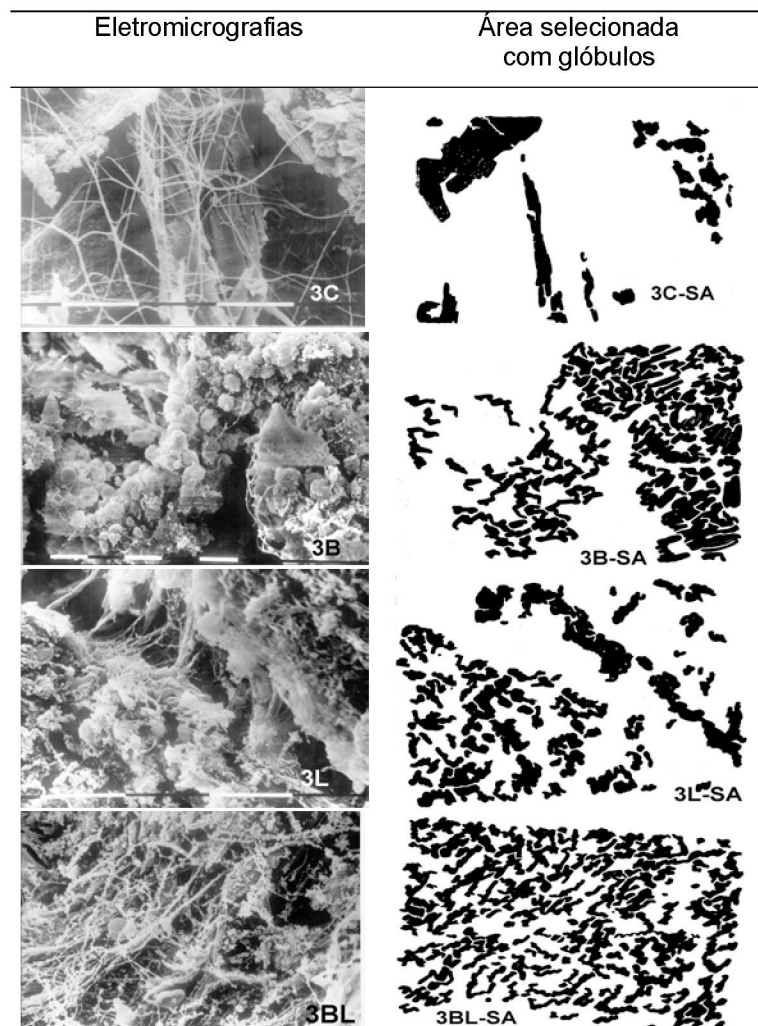
A Tabela 8 mostra as áreas correspondentes aos glóbulos observados nas Figuras 14 e 15. As menores áreas correspondentes aos glóbulos foram exibidas pelos controles de 1 semana (14,33%) e 3 semanas (17,75%). As maiores áreas foram observadas com o uso de biomateriais, principalmente em 1B (69,24%). Este fato era esperado uma vez que a biocerâmica é um composto inorgânico, compacto e denso, e deve ser lentamente absorvido pelo organismo. Mesmo assim, uma redução para menos da metade (3B = 33,84%) foi observada na terceira semana de osteopromoção. 1L (18,38%) apresentou área de glóbulos ligeiramente maior que 1C (14,33%), mas muito superior quando comparando três semanas de osteopromoção (3C = 17,74% e 3L = 28,26%). A associação de biomateriais mostrou o mesmo grau de glóbulos, independentemente do tempo (1BL = 44,70% e 3BL = 41,97%).

FIGURA 14 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO I (C, B, L, BL; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO)



(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplo: (1C) 1 semana do controle; (1C-SA) área selecionada do controle 1 semana; B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial, BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial.

FIGURA 15 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO II (C, B, L, BL; 3 SEMANAS)



(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplo: (3C) 3 semanas do controle; (3C-SA) área selecionada do controle 3 semanas; B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial, BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial.

TABELA 8 – ÁREAS COM GLÓBULOS OBSERVADAS EM MEV, GRUPOS I E II (C, B, L, BL; 1 E 3 SEMANAS)

Amostra	Área selecionada (SA), μm^2	Área com glóbulos, %
1C	349,45	14,33
1B	1934,14	69,24
1L	746,69	18,38
1BL	329,41	44,70
3C	340,8	17,74
3B	2549,93	33,84
3L	403,21	28,26
3BL	669,8	41,97

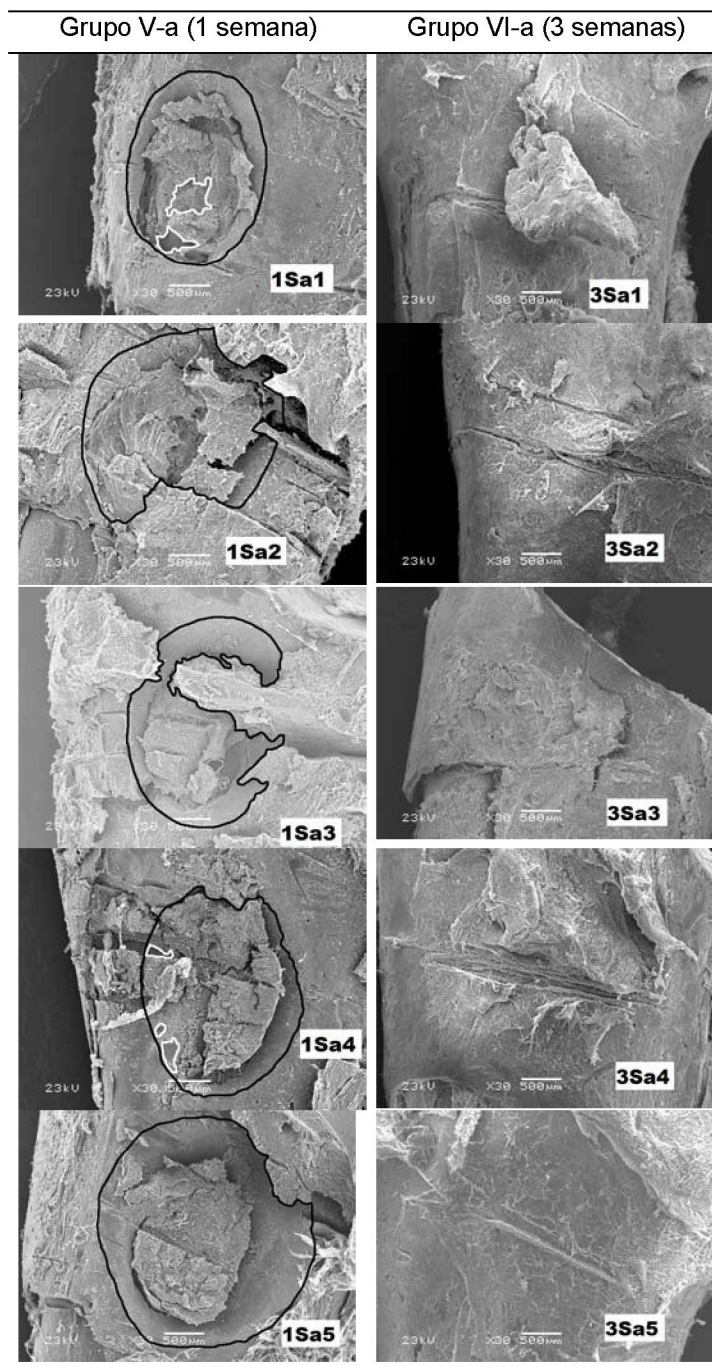
(Nx) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra. Exemplo: (1C) 1 semana do controle; B = biocerâmica, L = osso liofilizado comercial, BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial.

4.3.2 Grupos V e VI (Sa e Se; 1 e 3 semanas)

4.3.2.1 Exposição Radicular

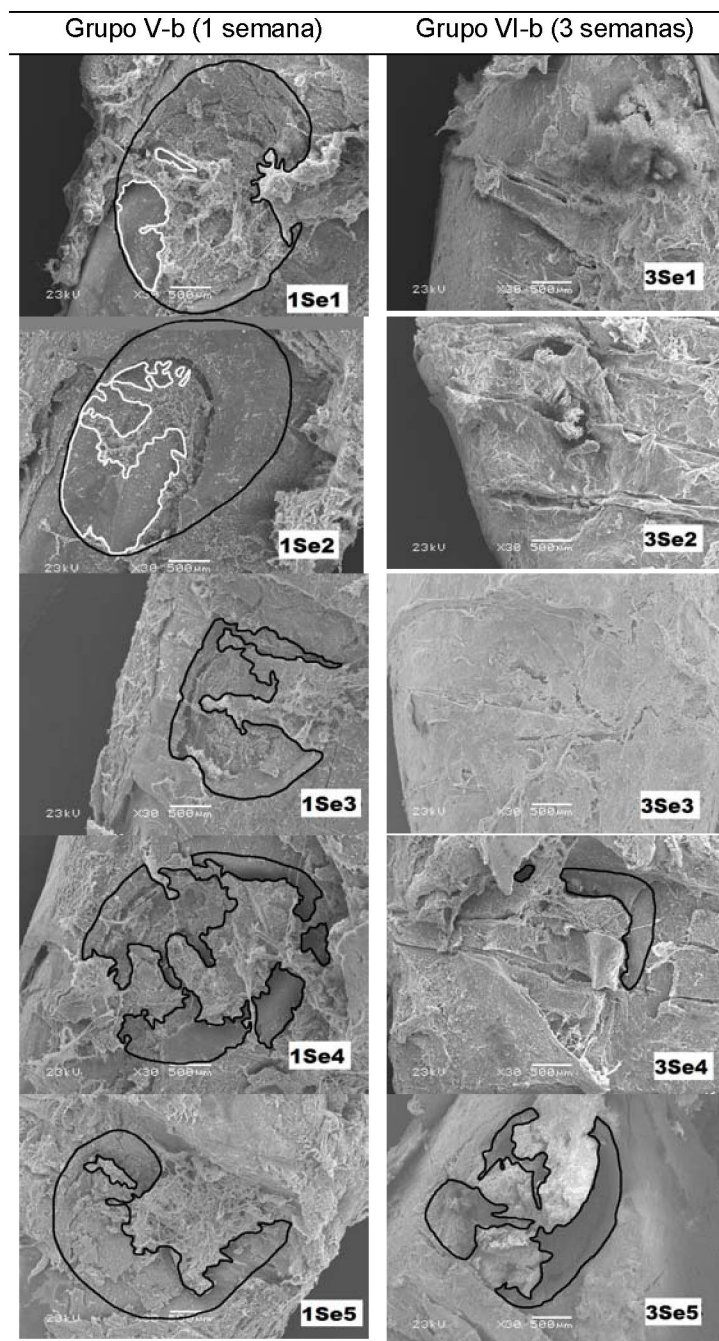
O grau de exposição radicular foi avaliado entre as amostras dos Grupos V e VI, no estudo e 1 e 3 semanas de osteopromoção do osso ovino (Fig. 16 e 17, e Tab. 9). A maior exposição radicular observada (30,92%) ocorreu para o animal 2, do grupo V-b, ou seja, com enxerto de osso ovino esterilizado com óxido de etileno (1Se2). Outro animal deste grupo (1Se1) também apresentou uma exposição de 11,41%, mas os outros 3 animais não tiveram exposição. O grupo V, com uso de biomaterial autoclavado (GV-a), também apresentou 3 casos de exposição radicular, mas em menor grau. O desvio padrão global para este parâmetro foi de 2,4% para GV-a e GVI-a (osso ovino autoclavado), e de 10,0% para GV-b e GVI-b (osso ovino esterilizado com óxido de etileno). Todas as amostras do Grupo VI (3 semanas) não apresentaram exposição radicular. Assim como nos Grupos I e II, nas quais se usou algum biomaterial, nestas amostras também houve a manutenção do volume tecidual.

FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR, GRUPOS V-a E VI-a (Sa; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)



(linha preta) Área de exposição do defeito. (linha branca) Área de exposição radicular. (NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplo: (1Sa1) 1 semana do osso ovino autoclavado, animal 1.

FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR, GRUPOS V-b E VI-b (Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)



(linha preta) Área de exposição do defeito. (linha branca) Área de exposição radicular. (NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplo: (1Se1) 1 semana do osso ovino esterilizado por oxido de etileno, animal 1.

TABELA 9 - VALORES (%) DAS ÁREAS DE EXPOSIÇÃO RADICULAR EM RELAÇÃO À ÁREA DE DEFEITO, GRUPOS V E VI (Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)

Grupo	Amostra	Área de defeito exposta (mm ²), preto	Área de exposição radicular (mm ²),branco	Exposição (%)
V-a	1Sa1	3,22	0,24	7,45
	1Sa2	4,20	0,00	0,00
	1Sa3	2,83	0,03	1,06
	1Sa4	3,71	0,10	2,69
	1Sa5	6,08	0,00	0,00
V-b	1Se1	5,17	0,59	11,41
	1Se2	5,53	1,71	30,92
	1Se3	2,12	0,00	0,00
	1Se4	3,10	0,00	0,00
	1Se5	2,88	0,00	0,00
VI-a	3Sa1	0,00	0,00	0,00
	3Sa2	0,00	0,00	0,00
	3Sa3	0,00	0,00	0,00
	3Sa4	0,00	0,00	0,00
	3Sa5	0,00	0,00	0,00
VI-b	3Se1	0,00	0,00	0,00
	3Se2	0,00	0,00	0,00
	3Se3	0,00	0,00	0,00
	3Se4	0,65	0,00	0,00
	3Se5	2,63	0,00	0,00

(NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplos: (1Sa1) 1 semana do osso ovino autoclavado, animal 1; (3Se1) 3 semanas do osso ovino esterilizado com óxido de etileno, animal 1.

4.3.2.2 Diâmetro de Fibras e Feixes

A Tabela 10 exibe o diâmetro de fibras e feixes, selecionados de todas as eletromicrografias que apresentaram estruturas filiformes nos Grupos V e VI. As estruturas filiformes únicas, consideradas como fibras, atingiram valores médios de 0,15 µm em todas as amostras destes Grupos. Por outro lado, os grupos de estruturas filiformes (ou conjunto de fibras), considerados como feixes, tiveram uma grande variação de espessura, variando de 2,11µm (3Sa3) a 65,13µm (1Se4). A média para

cada subgrupo variou de 27,78 μm (GVI-a, 3Sa) a 42,67 μm (GVI-b, 3Se), enquanto os valores de GV-a (1Sa) atingiram as medias de 32,03 μm e GV-b (1Se) de 34,24 μm .

TABELA 10 - DIÂMETRO DE FIBRAS/FEIXES OBSERVADOS EM MEV, GRUPOS V E VI (Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)

Grupo	Amostras*	Diâmetro, μm	
		Mínimo (fibra)	Máximo (feixe)
GV-a	1Sa1	0,15	2,51
	1Sa2	0,15	23,72
	1Sa3	0,15	51,38
	1Sa4	0,15	22,08
	1Sa5	0,15	47,44
GV-b	1Se1	0,15	31,75
	1Se2	0,15	10,71
	1Se3	0,15	23,60
	1Se4	0,15	65,13
	1Se5	0,15	40,01
GVI-a	3Sa1	0,15	26,18
	3Sa2	0,15	37,22
	3Sa3	0,15	2,11
	3Sa4	0,15	64,56
	3Sa5	0,15	8,85
GVI-b	3Se1	0,15	61,52
	3Se2	0,15	17,48
	3Se3	0,15	71,80
	3Se4	0,15	43,97
	3Se5	0,15	18,61

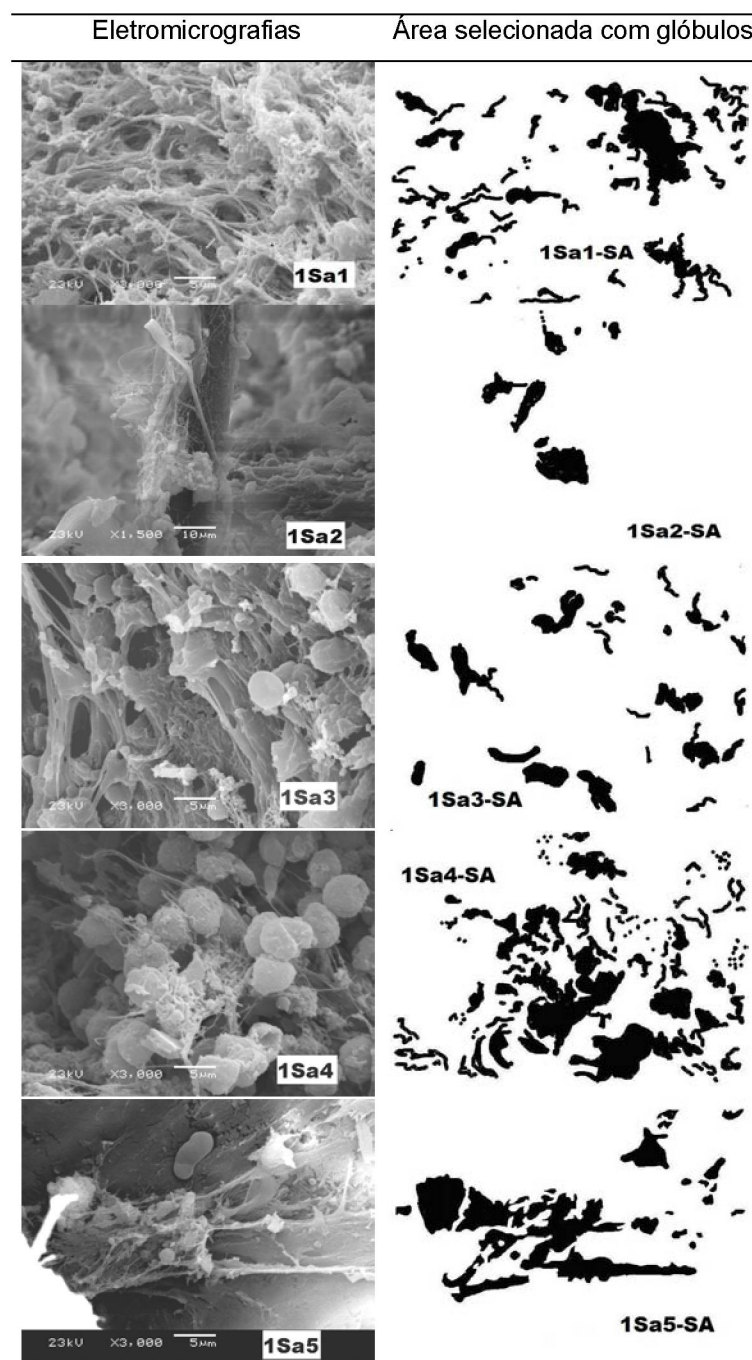
(NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplos: (1Sa1) 1 semana do osso ovino autoclavado, animal 1; (3Se1) 3 semanas do osso ovino esterilizado com óxido de etileno, animal 1.

4.3.2.3 Área com Glóbulos de provável mineralização

De acordo com as Figuras 18, 19, 20 e 21 e a Tabela 11, pode-se observar o padrão de ocorrência de glóbulos, das amostras com enxerto de osso ovino, exibido sob a forma de área e porcentagem. Na amostra com osso ovino autoclavado (Sa), a variação percentual na primeira semana foi de 4,18% (1Sa2) a 23,13% (1Sa4), com média de 14,39%. Na terceira semana a variação mudou de 0,00% (não detectada em 3Sa2) para 20,13% (3Sa3), e uma média de 9,81%. Nas amostras que se usou o osso

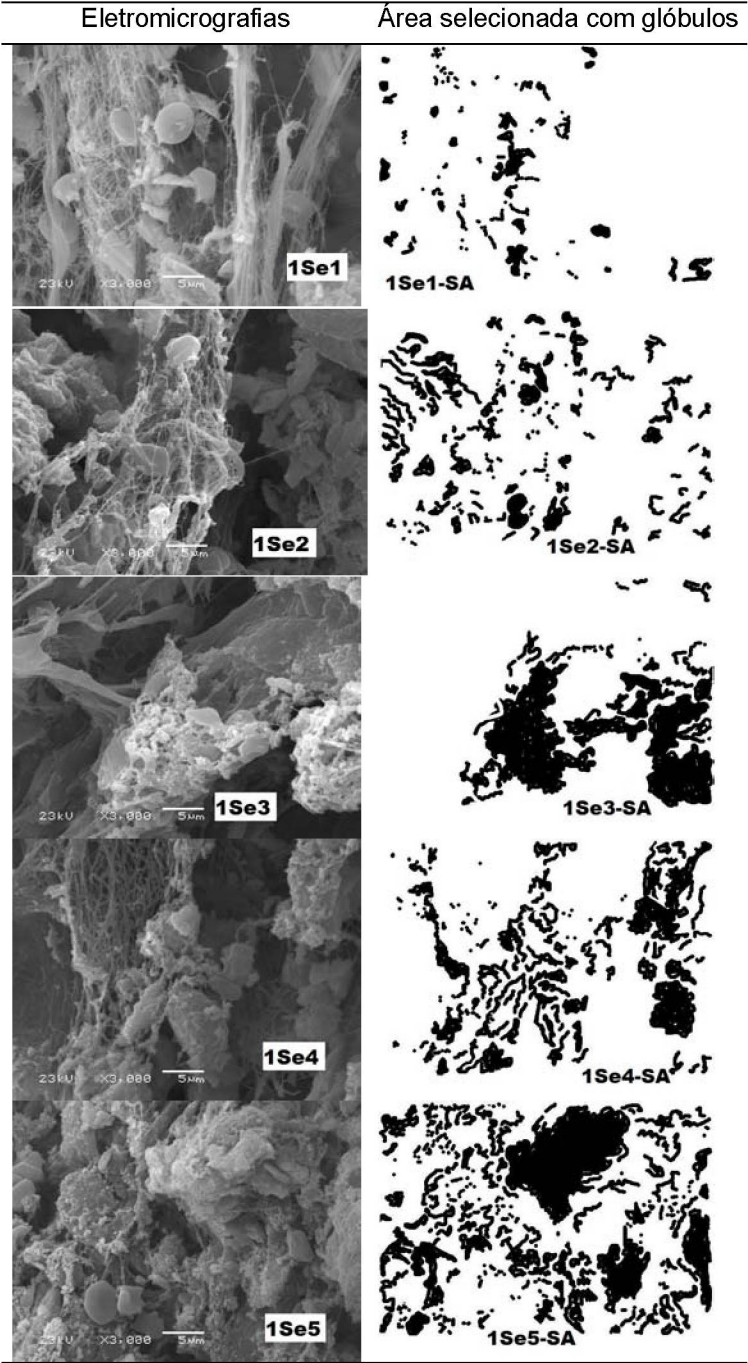
ovino esterilizado com óxido de etileno, a primeira semana atingiu 6,45% (1Se1) de superfície com área globular a 37,90% (1Se5), e conseqüente média de 21,12%. Já na terceira semana de osteopromoção o padrão de área com glóbulos foi menor: de 0,25% (3Se4) a 12,76% (3se1), o que decresceu a média para 5,63%.

FIGURA 18 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO V-a (Sa; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO)



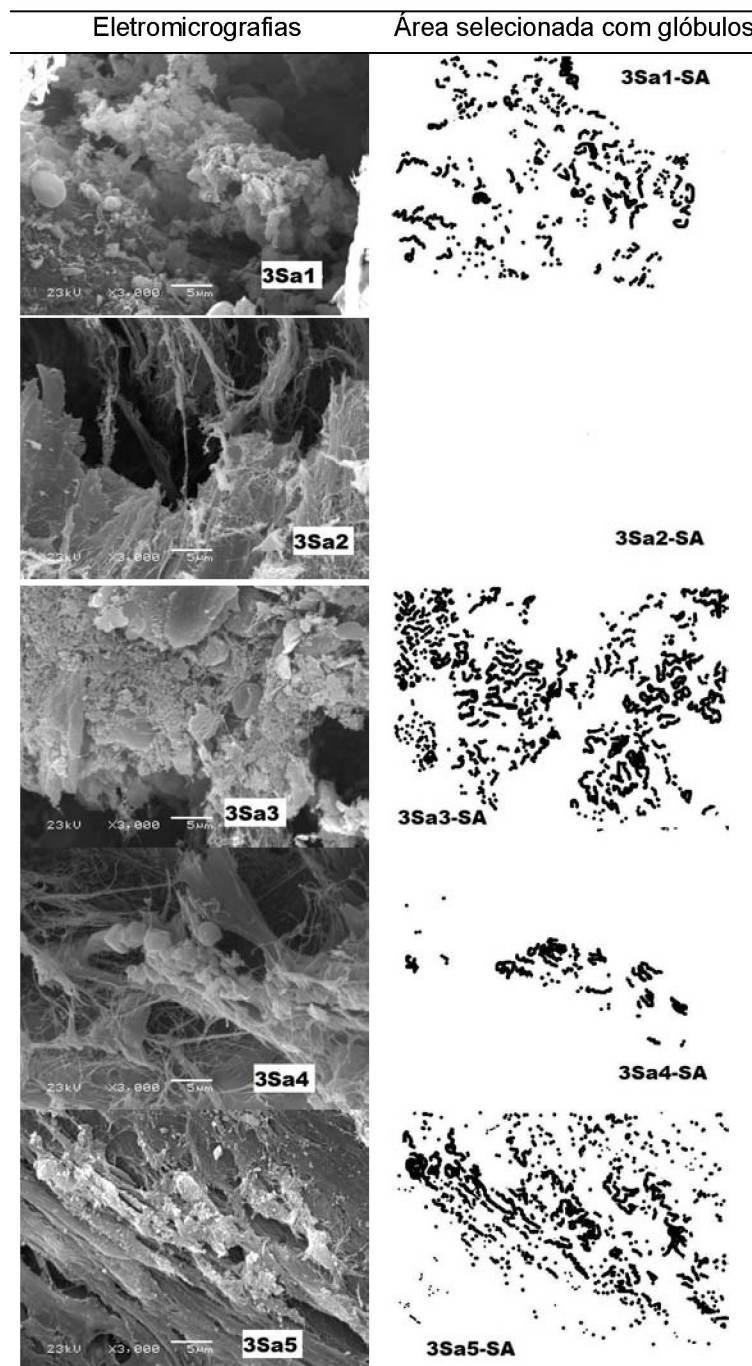
(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplos: (1Sa1) 1 semana do osso ovino autoclavado, animal 1; (1Sa1-SA) Área selecionada de osso ovino autoclavado 1 semana, animal 1

FIGURA 19 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO V-b (Se; 1 SEMANA DE OSTEOPROMOÇÃO)



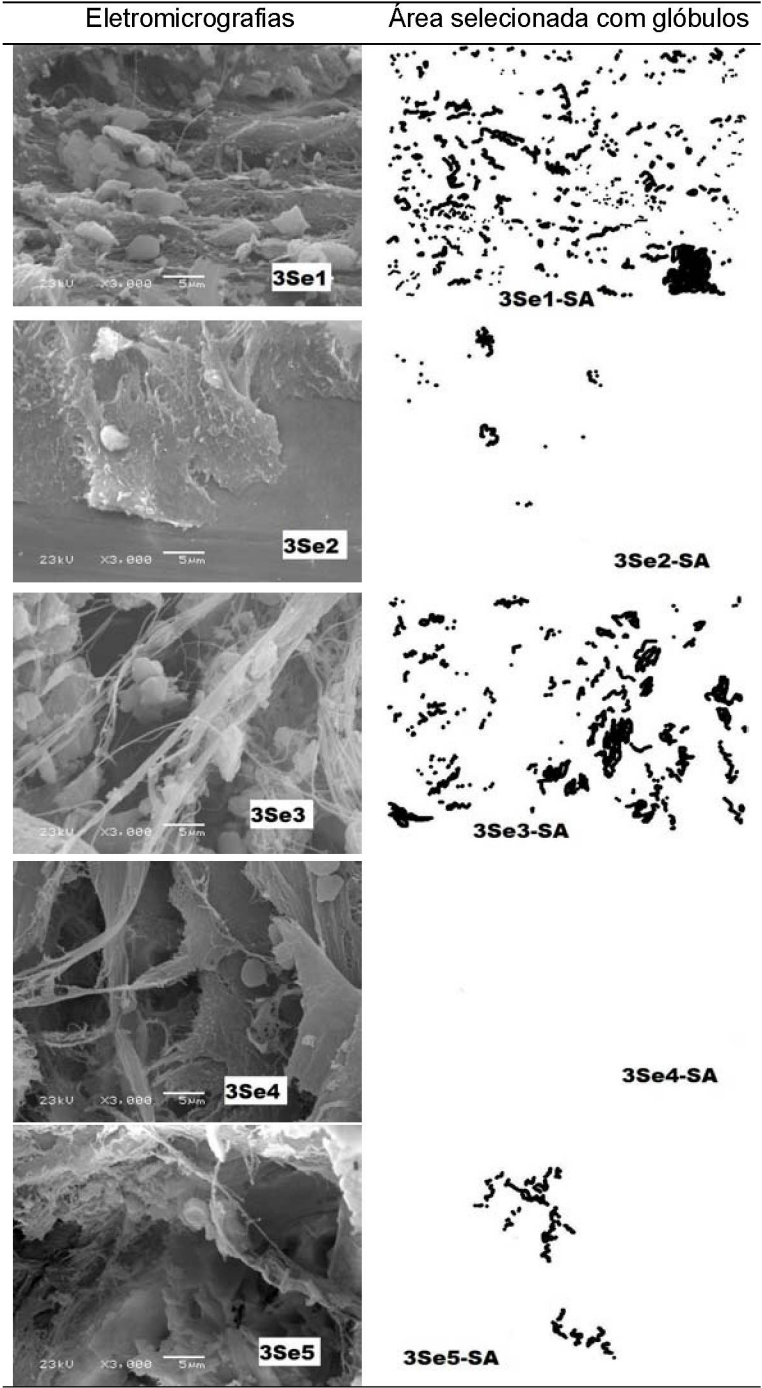
(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplos: (1Se1) 1 semana do osso ovino esterilizado com óxido de etileno, animal 1; (1Sa1-SA) Área selecionada de osso ovino esterilizado com óxido de etileno 1 semana, animal 1.

FIGURA 20 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO VI-a (Sa; 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)



(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplos: (3Sa1) 3 semanas de osso ovino autoclavado, animal 1; (3Sa1-SA) Área selecionada de osso ovino autoclavado 3 semanas, animal 1.

FIGURA 21 - ELETROMICROGRAFIAS COM GLÓBULOS DO GRUPO VI-b (Se; 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)



(Nx-SA) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, SA = área selecionada. Exemplos: (3Se1) 3 semanas do osso ovino esterilizado com óxido de etileno, animal 1; (3Se1-SA) Área selecionada de osso ovino esterilizado com óxido de etileno 3 semanas, animal 1.

TABELA 11 – ÁREAS COM GLÓBULOS OBSERVADAS EM MEV, GRUPOS V E VI (Sa e Se; 1 E 3 SEMANAS DE OSTEOPROMOÇÃO)

Grupo	Amostra	Área selecionada (SA), μm^2	Área com glóbulos, %
GV-a	1Sa1	237,03	16,81
	1Sa2	222,35	4,18
	1Sa3	138,89	10,75
	1Sa4	309,56	23,13
	1Sa5	204,27	17,07
GV-b	1Se1	96,64	6,45
	1Se2	209,82	15,64
	1Se3	303,62	22,66
	1Se4	307,28	22,97
	1Se5	510,09	37,90
GVI-a	3sa1	140,29	10,19
	3Sa2	0,00	0,00
	3Sa3	272,96	20,13
	3Sa4	45,01	3,38
	3Sa5	201,18	15,33
GVI-b	3Se1	181,34	12,76
	3Se2	12,97	0,91
	3Se3	154,38	11,81
	3Se4	3,29	0,25
	3Se5	33,71	2,41

(NxZ) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra, Z = número do animal. Exemplos: (1Sa1) 1 semana do osso ovino autoclavado, animal 1; (3Se1) 3 semanas do osso ovino esterilizado por oxido de etileno, animal 1.

4.3.3 Normalização dos Resultados em MEV

A Tabela 12 sumariza todas as características morfométricas analisadas em MEV (um total de 302 imagens). Os valores foram comparados ao controle 1 semana, que foi utilizado como valor de referência. Como nas amostras de osso ovino as características de exposição radicular e área com glóbulos foram aferidas nos 5 indivíduos de cada grupo, a normalização tomou como base as médias dos valores relatados anteriormente.

TABELA 12 – CARACTERÍSTICAS DE MEV NORMALIZADAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE 1 SEMANA

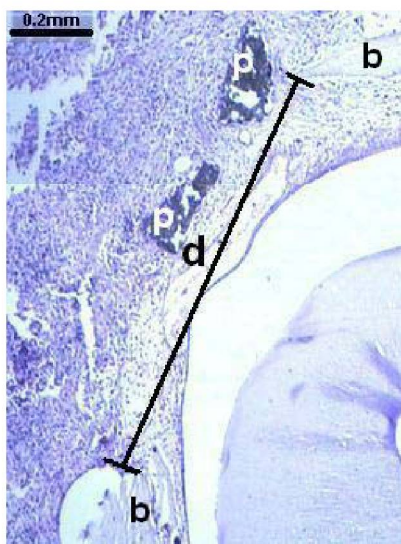
Amostra	Exposição radicular	Fibras	Feixes	Área com glóbulos
1C	1,0	1,0	1,0	1,0
1B	1,1	2,1	0,5	4,8
1L	0,5	5,7	0,2	1,3
1BL	1,1	2,6	0,1	3,1
1Sa	0,2*	2,1	0,9	1,0*
1Se	0,7*	2,1	1,2	1,5*
3C	0,3	1,0	0,9	1,2
3B	1,3	2,6	0,4	2,4
3L	1,8	1,9	0,3	2,0
3BL	0,3	1,9	0,1	2,9
3Sa	0,0*	2,1	1,2	0,7*
3Se	0,0*	2,1	1,3	0,4*

(Nx) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra. Exemplo: (1C) 1 semana do controle. B = biocerâmica; L = osso liofilizado comercial; BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial; Sa = osso ovino autoclavado; Se = osso ovino esterilizado com óxido de etileno. (*) Valores correspondentes à média de 5 amostras.

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ – GRUPOS III E IV (C, B, L, BL, Sa E Se; 1 E 3 SEMANAS)

A partir da análise das 427 imagens obtidas em microscopia de luz pode-se avaliar várias características histológicas. Um dos parâmetros considerados, por exemplo, foi o diâmetro do defeito, ou distância entre as bordas ósseas, avaliado na porção mediana deste: nos cortes seriados, a imagem que apresentou a maior distância entre as bordas ósseas foi selecionada, nas 3 amostras de cada tratamento (Figura 22). A Tabela 13 mostra a média destes valores, bem como a normalização dos mesmos em relação ao controle 1 semana.

FIGURA 22 – CÁLCULO DO DIÂMETRO DO DEFEITO NA REGIÃO MEDIANA, AMOSTRA 1BL3



(1BL3) Amostra com biocerâmica + osso liofilizado comercial, 1 semana de osteopromoção, animal 3. (d) Diâmetro do defeito. (b) Margem óssea. (p) Partícula de biocerâmica.

Na primeira semana, a menor média para o diâmetro do defeito foi 0,6mm (1Se), enquanto que a maior foi 1,2mm (1BL). Na terceira semana, a menor média observada foi 0,4mm (3Sa) e a maior foi 1,3mm (1Se).

TABELA 13 – VALORES MÉDIOS DOS DIÂMETROS DE DEFEITO

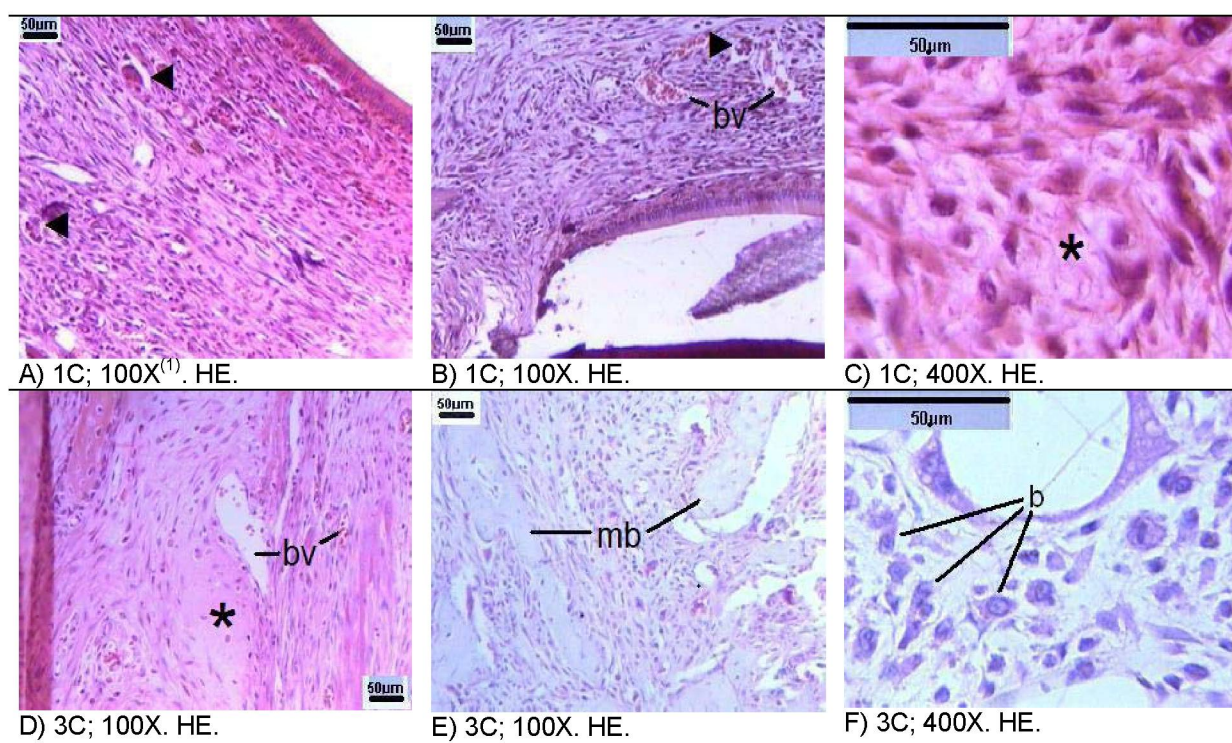
Amostra	Diâmetro médio do defeito (mm)	Normalização em relação a 1C (0,8mm)
1C	0,8	1,0
1B	1,0	1,3
1L	0,7	0,9
1BL	1,2	1,5
1Sa	1,1	1,4
1Se	0,6	0,8
3C	0,6	0,8
3B	0,8	1,0
3L	0,6	0,8
3BL	0,7	0,9
3Sa	0,4	0,5
3Se	1,3	1,6

(Nx) N = número correspondente à semana, x = tipo da amostra. Exemplo: (1C) 1 semana do controle. B = biocerâmica; L = osso liofilizado comercial; BL = biocerâmica + osso liofilizado comercial; Sa = osso ovino autoclavado; Se = osso ovino esterilizado com óxido de etileno.

A Figura 23 mostrou as imagens A, B, e C que correspondem aos cortes histológicos usados como controle (apenas com coágulo cicatricial) de 1 semana (1C). Pode-se observar um tecido com infiltrado inflamatório crônico, típico tecido de granulação, com presença, ainda que pequena, de células volumosas do tipo macrófágicas e células gigantes multinucleadas (CGMs) (Figs. 23A e 23B). A presença de vasos sangüíneos participantes da neovascularização no local de reparo foi observada na Figura 23B. Em magnificação original de 400X, observou-se um tecido conjuntivo denso com proliferação blástica, provavelmente osteo e fibroblástica, permeada por matriz extracelular, parte da qual pode se constituir em matriz óssea, ou osteóide (Fig. 23C).

Os cortes histológicos D, E e F correspondentes às amostras do controle de 3 semanas (3C) também apresentaram a presença de infiltrado inflamatório crônico. Aparentemente um pouco mais discreto do que o observado em 1C, permeando uma neoformação óssea mais adiantada: osso imaturo (Fig. 23D) e maduro (Fig. 23E). O aspecto de neoformação vascular e de ocorrência de células multinucleadas semelhante a 1C (Fig. 23D) também pode ser observado, bem como a presença de células mononucleares estreladas blásticas em proliferação (Fig. 23F).

FIGURA 23 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS CONTROLE 1 E 3 SEMANAS

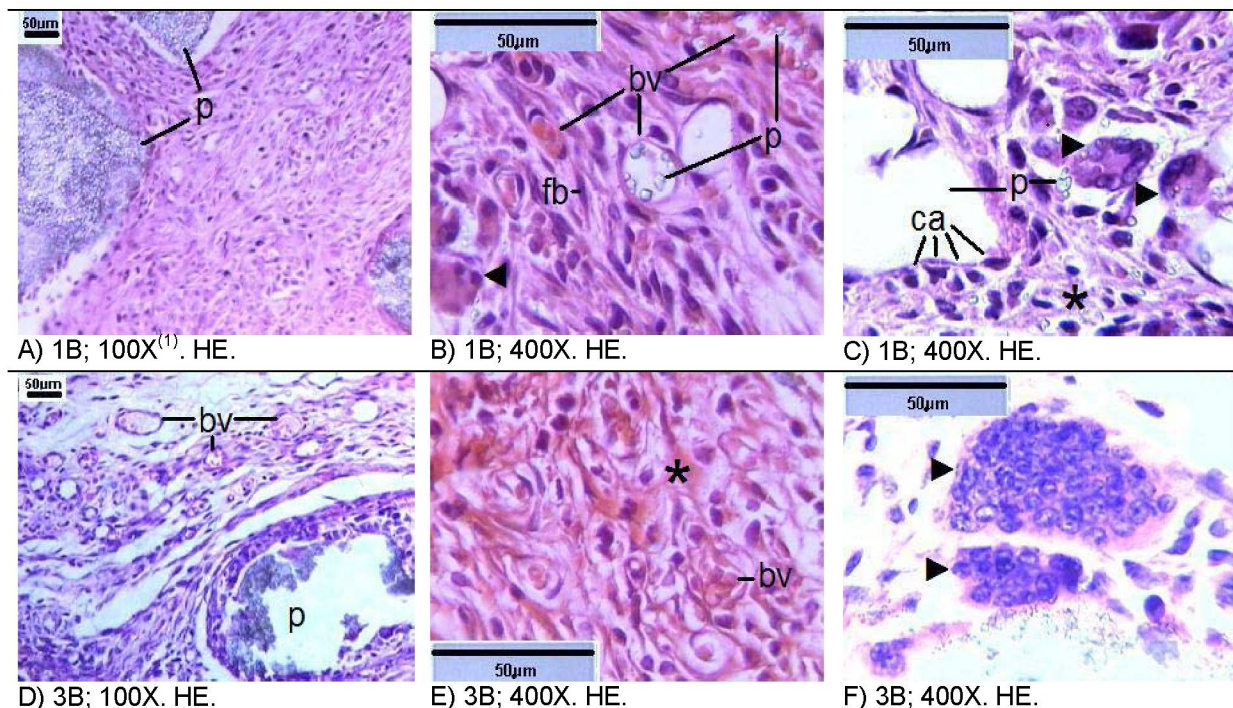


(1C) Amostras do controle 1 semana. (3C) Amostras do controle 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (►) Célula gigante multinucleada. (bv) Vaso sangüíneo. (*) Osteóide ou osso imaturo. (mb) Osso maduro. (b) Células blásticas estreladas. (1) Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

A Figura 24 mostrou os cortes histológicos típicos das amostras que se monitorou a aplicação da biocerâmica. As imagens de osteopromoção de uma semana (1B) revelaram as partículas de biomaterial (Figs. 24A, 24B e 24C), além do aspecto do tecido inflamatório crônico, o qual se demonstrou com intensidade um pouco mais leve do que 1C, porém com uma neovascularização (Fig. 24B) e um infiltrado macrofágico mais intensos (Figs. 24B e 24C). A presença de células mesenquimais indiferenciadas e células fusiformes semelhantes a fibroblastos (Fig. 24B), proliferação semelhante a 1C, também foi visível. Espaços menos celularizados e com maior quantidade de matriz extracelular demonstraram semelhança com 1C; regiões sugestivas de formação de osteóide (Fig. 24C). Ainda nesta amostra, pode-se observar um alinhamento celular ao redor das partículas de biocerâmica (Figs. 24A e 24C), o que sugere um íntimo contato entre os mesmos.

Os cortes das amostras 3B (biocerâmica, 3 semanas) apresentaram um tecido de granulação, com infiltrado inflamatório crônico de intensidade similar a 3C ao redor das partículas do biomaterial (Fig. 24D), porém mais rico em vasos sanguíneos (o que sugere maior edema). Assim, a angiogênese foi mais intensa do que 3C (Figs. 24D e 24E), a proliferação celular similar, enquanto a presença de osteóide foi menos marcante do que 3C (Fig. 24E). Em regiões próximas ao biomaterial a presença de macrófagos e CGMs foi bem maior do que 3C - notar a quantidade de núcleos nestes exemplares (Fig. 24F).

FIGURA 24 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE BIOCERÂMICA 1 E 3 SEMANAS

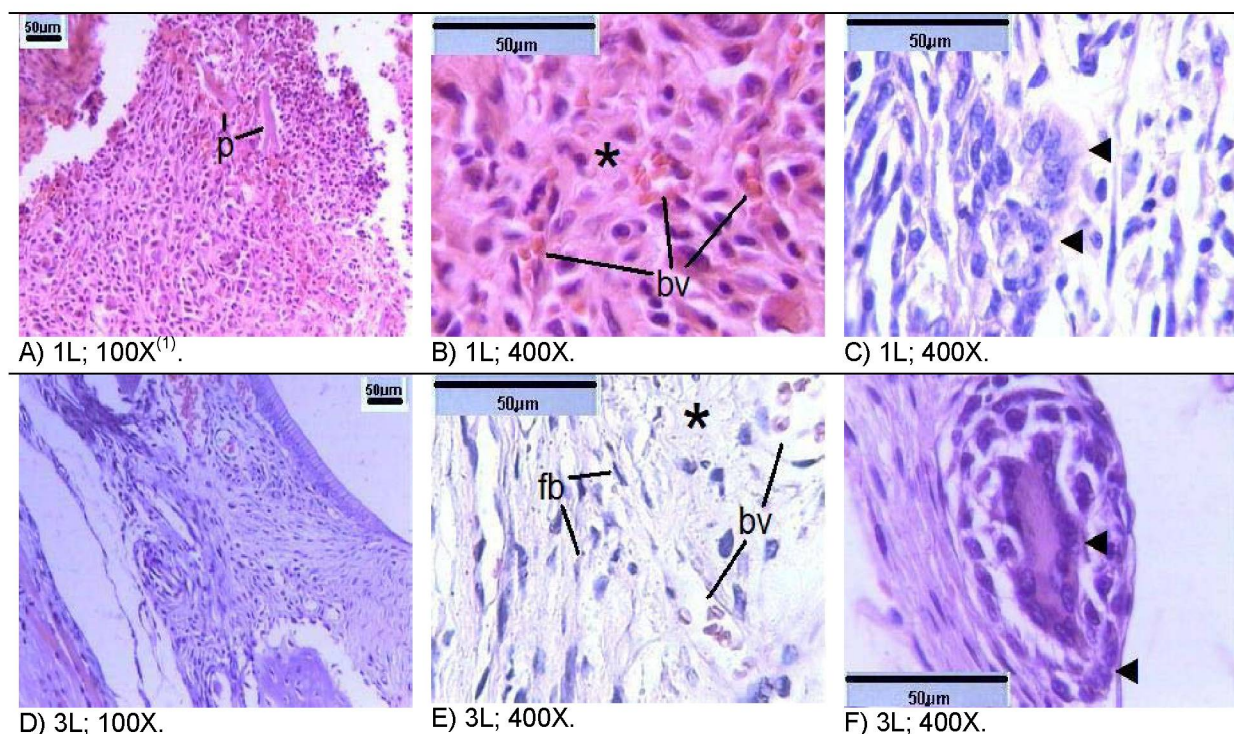


(1B) Amostras de biocerâmica 1 semana. (3B) Amostras de biocerâmica 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (p) Partícula de biomaterial. (►) Célula gigante multinucleada. (bv) Vaso sanguíneo. (fb) Fibroblasto. (*) Osteóide ou osso imaturo. (ca) Alinhamento celular. (¹) Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

A Figura 25 mostrou os cortes histológicos referentes ao uso de osso liofilizado comercial. As amostras 1L (osso liofilizado, 1 semana) demonstraram um infiltrado inflamatório crônico mais intenso do que 1C e também agudo, grande número de células circundando partículas do biomaterial (Fig. 25A), uma proliferação blástica similar a 1C e conseqüente produção de matriz (Fig. 25B). Além disso, notou-se uma angiogênese (Fig. 25B) e uma ocorrência de CGMs e células macrofágicas mais intensas que 1C (Fig. 25C).

Amostras 3L demonstraram um padrão de tecido de granulação com infiltrado inflamatório crônico similar a 3C (Fig. 25D), porém com presença de CGMs e células macrofágicas mais intensa (Fig. 25F). A neoformação vascular também se mostrou maior que 3C (Fig. 25E). A proliferação blástica foi semelhante, permeada por células com aspecto de fibroblastos e outras envoltas por matriz, provavelmente osteóide (Fig. 25E).

FIGURA 25 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS OSSO LIOFILIZADO COMERCIAL 1 E 3 SEMANAS

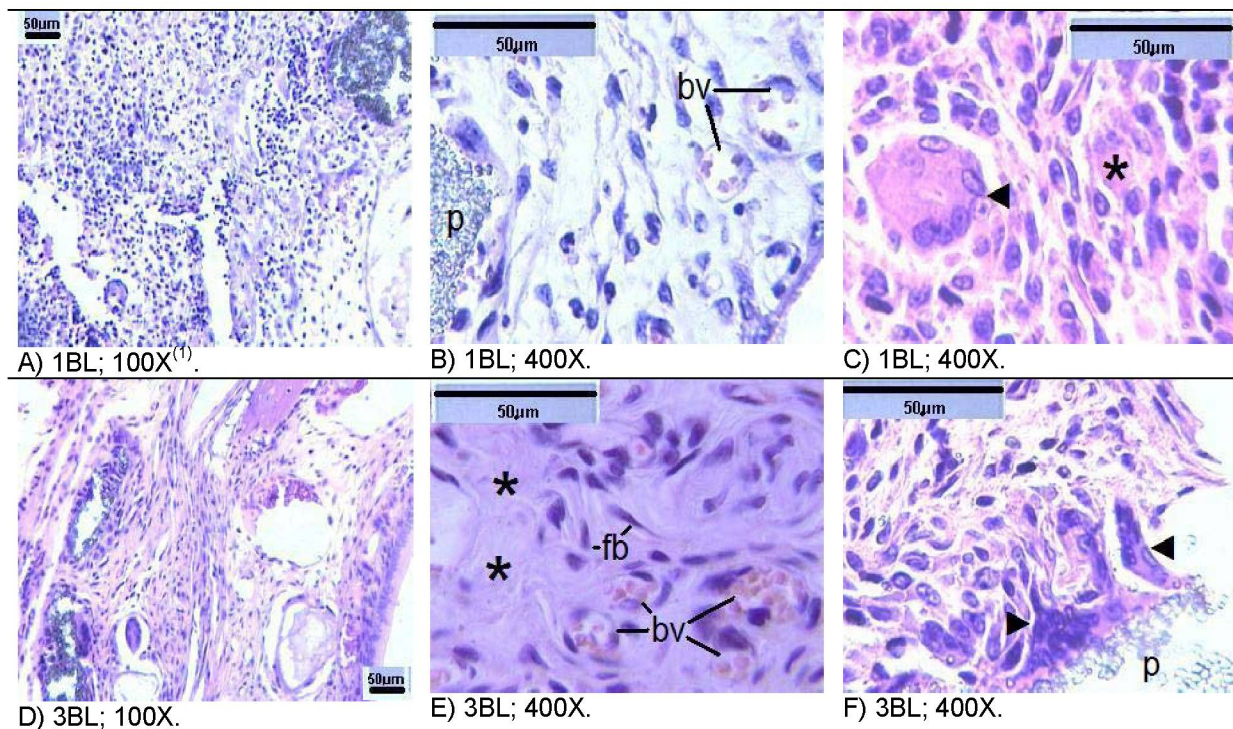


(1L) Amostras de osso liofilizado comercial 1 semana. (3L) Amostras de osso liofilizado comercial 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (p) Partícula de biomaterial. (*) Osteóide ou osso imaturo. (bv) Vaso sanguíneo. (►) Célula gigante multinucleada. (fb) Fibroblasto. (') Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

A Figura 26 mostrou os cortes referentes à associação de dois biomateriais: em 1BL (biocerâmica com osso liofilizado, 1 semana), percebeu-se um tecido de granulação com infiltrado inflamatório crônico e agudo (Fig. 26A). Observou-se que próximo ao biomaterial a neovascularização foi maior que em 1C (Fig. 26B), a proliferação celular e o aparecimento de regiões de possível osteogênese foram similares a 1C, e a ocorrência de CGMs e macrófagos foi maior (Fig. 26C).

Em 3BL observou-se a manutenção do tecido de granulação com infiltrado inflamatório crônico de intensidade similar a 3C (Fig. 26D), tecido conjuntivo denso, e angiogênese bem mais intensa que 3C (Fig. 26E). Também foi possível perceber áreas de formação extracelular similar a osso imaturo, em menor intensidade que 3C, permeadas por células semelhantes a fibroblastos (Fig. 26E). A proliferação celular foi praticamente igual ao padrão encontrado em 3C. A presença de CGMs e macrófagos, próximos a partículas de biomaterial, também foi bem mais intensa que em 3C (Fig. 26F).

FIGURA 26 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE BIOCERÂMICA COM OSSO LIOFILIZADO COMERCIAL 1 E 3 SEMANAS

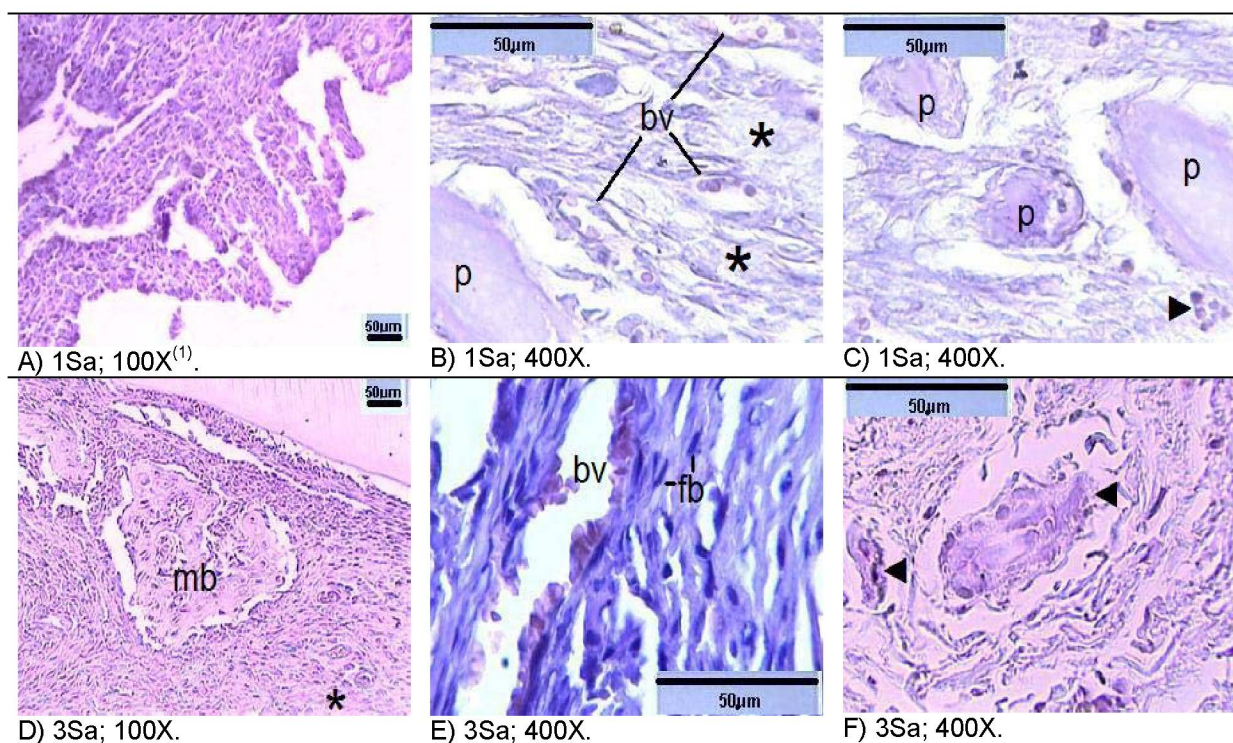


(1BL) Amostras de biocerâmica mais osso liofilizado comercial 1 semana. (3BL) Amostras de biocerâmica mais osso liofilizado comercial 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (p) Partícula de biomaterial. (bv) Vaso sanguíneo. (►) Célula gigante multinucleada. (*) Osteóide ou osso imaturo. (fb) Fibroblasto. ⁽¹⁾ Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

As fotomicrografias das amostras de 1Sa (osso ovino autoclavado, 1 semana) revelaram a presença de um infiltrado inflamatório crônico e agudo, bem mais intenso que em 1C (Fig. 27A), com proliferação celular aparentemente menor que 1C, porém com neovascularização mais intensa (Fig. 27B). Regiões semelhantes a osteóides também foram encontradas, semelhantemente a 1C (Fig. 27B). O infiltrado macrofágico e CGMs (Fig. 27C) observados foram mais intensos que 1C, uma vez que partículas do biomaterial permeavam toda a região de enxerto (Figs. 27B e 27C).

Em 3Sa (osso ovino autoclavado, 3 semanas) observou-se a presença de um infiltrado inflamatório crônico um pouco mais intenso que 3C, com a presença de regiões semelhantes a osso imaturo e osso maduro (Fig. 27D). A proliferação celular foi mais fusiforme (fibroblastos) do que em 3C e a neovascularização mais intensa (Fig. 27E). O infiltrado macrofágico e CGMs ocorreram de forma mais intensa do que em 3C (Fig. 27F).

FIGURA 27 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE OSSO OVINO AUTOCLAVADO 1 E 3 SEMANAS



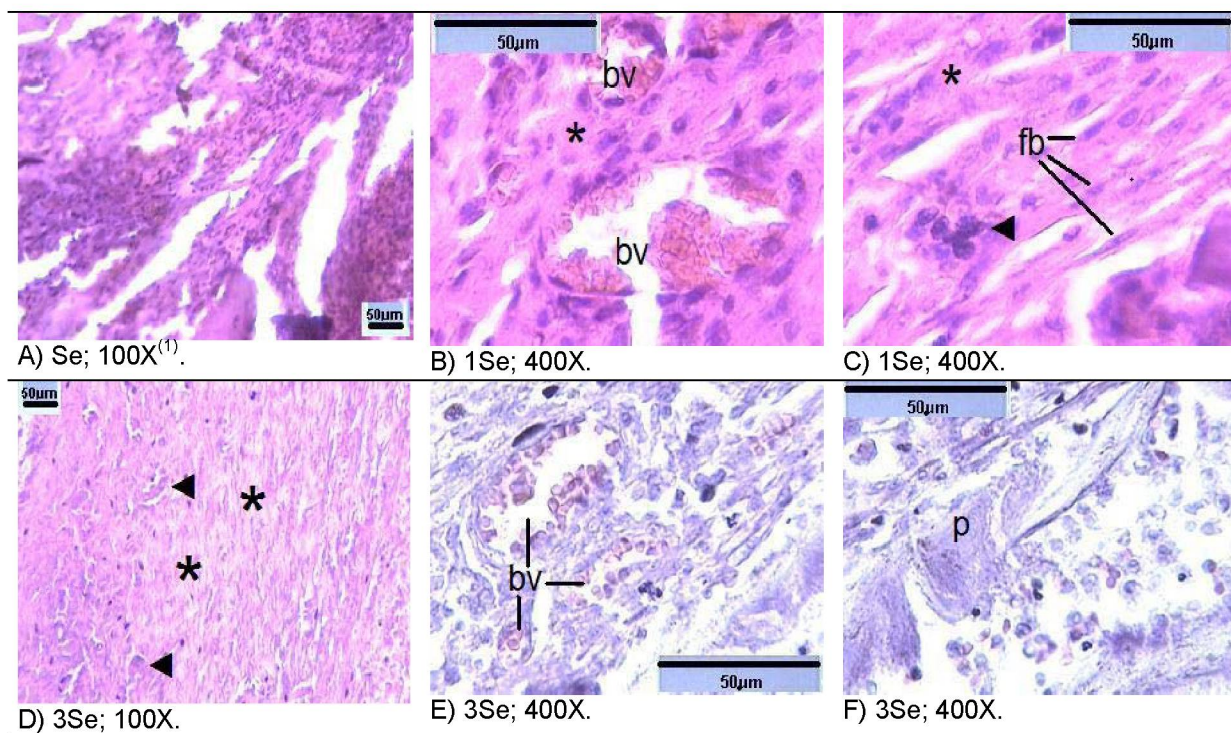
(1Sa) Amostras de osso ovino autoclavado 1 semana. (3Sa) Amostras de osso ovino autoclavado 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (p) Partícula de biomaterial. (bv) Vaso sanguíneo. (*) Osteóide ou osso imaturo. (►) Célula gigante multinucleada. (mb) Osso maduro. (fb) Fibroblasto. ⁽¹⁾ Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

As fotomicrografias das amostras de 1Se (osso ovino esterilizado com óxido de etileno, 1 semana) novamente mostraram a presença de um infiltrado inflamatório crônico, mais intenso que 1C, bem como um processo agudo (Fig. 28A). A presença de regiões de matriz foi semelhante às de osteóide em 1C, porém com uma neovascularização maior (Fig. 28B e 28C), e uma proliferação mais fusiforme (Fig. 28C). A ocorrência do infiltrado macrofágico e CGMs foi mais evidente do que em 1C (Fig. 28C).

Em 3Se (osso ovino esterilizado com óxido de etileno, 3 semanas), observou-se a presença de um infiltrado inflamatório crônico similar a 3C, com regiões de início de formação óssea menores e presença de macrófagos e CGMs mais intensa (Fig. 28D). A angiogênese desta amostra mostrou-se também mais intensa do que a observada em 3C (Fig. 28E). Em alguns locais, a presença de biomaterial demonstrou-se permeada por proliferação celular pouco fusiforme (Fig. 28F).

A Tabela 14 sumariza todas as condições biológicas encontradas na microscopia de luz das amostras, de acordo com as classificações adotadas.

FIGURA 28 - MICROSCOPIA DE LUZ DAS AMOSTRAS DE OSSO OVINO
ESTERILIZADO COM ÓXIDO DE ETILENO 1 E 3 SEMANAS



(1Se) Amostras de osso ovino esterilizado por oxido de etileno 1 semana. (3Se) Amostras de osso ovino esterilizado por oxido de etileno 3 semanas. (HE) Hematoxilina e eosina. (bv) Vaso sangüíneo. (*) Osteóide ou osso imaturo. (►) Célula gigante multinucleada. (fb) Fibroblasto. (p) Partícula de biomaterial. (1) Valor referente à magnificação original - todas as fotomicrografias da figura.

TABELA 14 - RESULTADOS DAS CONDIÇÕES BIOLÓGICAS OBSERVADAS EM MICROSCOPIA DE LUZ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MONITORAMENTO

Amostra	Tempo (semanas)	Classificação
C	1	ICG-CL + RC
C	3	ICG-CL + RT
B	1	ICG-CE + RC
B	3	ICG-CE + RC
L	1	ICG-CE + IA + RC
L	3	ICG-CE + RC
BL	1	ICG-CE + IA + RC
BL	3	ICG-CE + RC
Sa	1	ICG-CE + IA + RC
Sa	3	ICG-CE + RT
Se	1	ICG-CE + IA + RC
Se	3	ICG-CE + RC

(B) Biocerâmica. (L) Osso liofilizado comercial. (BL) Biocerâmica + osso liofilizado comercial. (Sa) Osso ovino autoclavado. (Se) Osso ovino esterilizado com óxido de etileno. (IA) Inflamação Aguda. (IC) Inflamação Crônica. (ICG-CL) Inflamação Crônica Granulomatosa – Células de Langhans. (ICG-CE) Inflamação Crônica Granulomatosa – Corpo Estranho. (RC) Reparo Cicatricial. (RT) Reparo Tecidual.

5 DISCUSSÕES

A escolha do rato como um modelo biológico de estudo confirmou várias vantagens: manipulação fácil, custos pequenos e resposta tecidual rápida. Os trabalhos científicos que utilizam experimentalmente este animal são praticamente incontáveis e o seu uso reporta pelo menos 200 anos (KWITEK-BLACK, 2000). Portanto, o animal utilizado no modelo biológico apresentado pareceu a opção mais lógica para os objetivos do estudo.

No que diz respeito à criação cirúrgica de um defeito ósseo para a pesquisa de biomateriais de enxerto, GENDLER (1986), RODRIGUEZ *et al.* (1997) e BOHNING *et al.* (1999) descrevem uma broca esférica para a simulação destes defeitos, considerada melhor do que uma broca do tipo *trephine* de acordo com BARTEE & CARR (1995). Esta escolha foi atribuída à produção de um defeito não trans-ósseo, uma vez que a ação da broca estava convenientemente limitada pela superfície da raiz do incisivo inferior direito do animal. O resultado obtido pela ação da broca, ou seja, um defeito delimitado e com espaço satisfatório para a inserção de biomateriais na região proposta foi facilmente obtido (Fig. 3).

Ainda em relação ao local anatômico escolhido para a cirurgia, também descrito por GREENE (1959), outros fatores influenciaram positivamente: 1) é de grande interesse para a Odontologia o estudo da neoformação óssea auxiliada por biomateriais na cavidade oral, uma vez que os movimentos de mastigação e salivação podem ser aspectos importantes, e que precisam ser considerados (NEWMAN *et al.*, 2004); 2) o uso de uma área anterior da cavidade oral permite um acesso intra-oral, da mesma maneira como é feito na clínica dental (ZAHEDI *et al.*, 1998); 3) o envolvimento do ligamento periodontal é freqüente na cirurgia oral, e representa uma fonte abundante de células-tronco e outros fatores responsáveis ao reparo do periodonto, como refletido pelo interesse crescente da comunidade científica neste tecido (BRETT *et al.*, 2002; SHIMAZU & MORISHITA, 2003).

A seleção dos biomateriais foi baseada nos seus mecanismos de ação. A biocerâmica (B) usada neste trabalho, o fosfato β -tricálcico, é um produto aloplástico

(biomaterial de enxerto sintético) com mecanismo de osteocondução (LOVELACE *et al.*, 1998) que pode preencher o defeito ósseo sem influenciar a atividade celular, e que pode ser absorvido pelo organismo. Por outro lado, o osso bovino desproteinado liofilizado comercial (L) é um produto xenogênico (biomaterial de enxerto com origem de espécie diferente), com mecanismo de osteoindução (EDWARDS *et al.*, 1998), capaz de induzir a atividade celular, como a dos osteoblastos, acelerando a neoformação óssea. YOUSOFI & DEHGHANI (2001) relatam a utilização de placas ósseas ovinas em um trabalho experimental com cães. Os resultados obtidos por estes autores revelam que o osso ovino pode ser tolerado por tecidos de um receptor de espécie diferente, e que pode agir como base para o reparo, sendo absorvido localmente e possuindo características osteogênicas. Portanto, o osso ovino também deve potencialmente conter as mesmas propriedades do osso bovino comercial. No presente trabalho, ao invés do uso de placas, como relatado na literatura, procurou-se obter um biomaterial fisicamente similar ao osso liofilizado comercial, sob a forma de partículas pequenas. Os processos de obtenção apresentados buscaram menores complexidade e custos, e nenhum composto químico foi utilizado de forma a interferir diretamente na qualidade das partículas obtidas, procurando-se manter ao máximo a integridade da estrutura óssea básica do animal doador. Outro fator que foi considerado é que a parte do animal usada como fonte (mandíbula) normalmente não é aproveitada na comercialização com fins alimentícios (carne), e por isso, na maioria das vezes desperdiçada (JOHNSON *et al.*, 2000).

A técnica utilizada na obtenção experimental do biomaterial, a partir do osso ovino, demonstrou de forma simples o fornecimento de tamanhos aparentemente adequados aos procedimentos cirúrgicos, uma vez que eram maiores que as de biocerâmica e menores que as de osso bovino comercial. Um fato que pode ter ligação com a busca de um tamanho ideal para as partículas de osso ovino foi o que ocorreu durante a microtomia dos espécimes nos quais se enxertou tais partículas. A espessura dos cortes histológicos das amostras com osso ovino precisou ser um pouco mais espesso (7 μm), enquanto nas demais amostras com biomateriais, apesar da presença de partículas exclusivamente cristalinas, como as de biocerâmica, os cortes tiveram a

espessura de 5 μm . Os cortes desta grandeza nas amostras com osso ovino apresentaram uma qualidade inferior, provocada por uma maior resistência da navalha durante a microtomia, o que pode ser atribuído provavelmente à formação de um tecido cicatricial mais compacto nestas amostras. YANG *et al.* (2003) descrevem uma resina especial para cortes de osso ovino descalcificado e também utilizam a espessura de 7 μm . De acordo com o relatado, o trabalho atual usou a parafina como material de emblocagem.

Esse achado na microtomia também pode advir da presença de um tecido reacional envoltório da região do enxerto mais resistente à ação da técnica de descalcificação (fato não detectável histologicamente nas fotomicroscopias), ou da presença de algum fator local inibidor da ação quelante do EDTA. Além disto, pode-se discutir que a região doadora para confecção do biomaterial, a cortical da mandíbula, camada óssea compacta com grande porção mineral, ou a própria metodologia de preparo tenham favorecido uma maior conservação do teor mineral, o que levou à formação de região de reparo ósseo mais resistente à microtomia. Neste caso, poderia ser considerado o fato de se utilizar este biomaterial em partículas ainda menores do que aquelas usadas na fase cirúrgica (por exemplo, $S1 < S2 = 1,27 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ a $0,61 \text{ mm}^2$), que poderiam ser mais facilmente integradas ao processo de remodelamento tecidual.

CARNEIRO *et al.* (2004) comparam através de análise elementar (EDS) a composição de biomaterial preparado a partir do fêmur bovino com o biomaterial obtido a partir da mandíbula de ovino. A análise revela a presença de cálcio (fêmur bovino: 35,26%; e mandíbula ovina: 75,62%), oxigênio (fêmur bovino: 21,66%; e mandíbula ovina: 3,76%), carbono (fêmur bovino: 17,18%; e mandíbula ovina: 2,41%) e fósforo (fêmur bovino: 15,43%; e mandíbula ovina: 16,23%). O cálcio e o fósforo estão relacionados ao teor de hidroxiapatita, o oxigênio relacionado à hidroxiapatita e proteínas, e o carbono aos compostos orgânicos. Assim, estas informações reforçam a idéia de um biomaterial ósseo a partir da mandíbula de ovino com porção mineral muito maior do que o osso bovino, e conseqüentemente uma porção orgânica bem menor.

Quanto aos métodos de esterilização apresentados, é importante salientar que o óxido de etileno deve manter compostos orgânicos mais intactos (PEKKARINEN *et al.*, 2004), enquanto que a autoclavagem deve levar a uma desnaturação de compostos orgânicos importantes, como proteínas morfogênicas de osso, devido ao aquecimento (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

As Tabelas 4 e 5 demonstraram a variação de tamanho das partículas de todos os biomateriais usados no estudo. Comparando os tamanhos máximos apenas, pode-se perceber que o tamanho original (Tab. 4) e após o período de monitoramento (Tab. 5) existe uma diferença muito grande. Duas hipóteses podem ser formuladas para esta questão: 1) ao acaso, as maiores partículas nunca foram coletadas dos recipientes onde se encontravam armazenadas, o que pode ser considerado como hipótese remota (mas não impossível), uma vez que o volume de biomaterial escolhido para a inserção era muito superior ao tamanho máximo das partículas no pré-cirúrgico; ou 2) realmente houve uma degradação das partículas de tamanho máximo relatadas na Tabela 4. Neste caso, pode-se considerar uma taxa aparente de degradação para cada biomaterial.

É possível dizer que quanto maior a taxa de degradação dos biomateriais maior a reação metabólica local dos tecidos envolvidos sobre os mesmos. De acordo com a variação existente entre as partículas de tamanho máximo das Tabelas 4 e 5 foi possível observar que a menor taxa aparente de degradação média (entre 1 e 3 semanas) foi a da biocerâmica (99,859%), com valor um pouco mais alto quando associada ao osso bovino comercial (99,919%), seguida pelas taxas de osso bovino comercial quando associado a biocerâmica, e osso ovino esterilizado por óxido de etileno ou autoclavado, que foram praticamente iguais (99,993%). A maior taxa aparente média de degradação foi a do osso bovino comercial (99,997%), ou seja, de acordo com este parâmetro, foi o material que passou pela maior metabolização tecidual local, quando utilizado sozinho, durante o tempo de 3 semanas. É possível que em prazos maiores esse achado possa ser diferente, uma vez que relatado por ARTZI *et al.* (2004), partículas de β -trifosfato de cálcio são mais rapidamente reabsorvidas do que partículas de osso bovino inorgânico.

Também é interessante notar que de acordo com a Tabela 5, o tamanho máximo de partícula de biocerâmica encontrada nas amostras de 1 semana ($0,53 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$) foi menor do que o encontrado nas amostras de 3 semanas ($0,91 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$), o que pode parecer antagônico, pois o lógico seria a ocorrência de partículas menores com o passar do tempo, ou seja, uma taxa de degradação maior quanto maior o tempo de monitoramento. Neste caso, voltamos à hipótese 1 do parágrafo anterior: durante a inserção de biocerâmica associada ao osso comercial, as partículas inseridas inicialmente nos defeitos dos animais do grupo 1 semana ou eram menores do que as inseridas nos defeitos dos animais pertencentes ao grupo 3 semanas, ou por algum motivo, apesar da sutura, as maiores partículas de 1B foram perdidas do enxerto para o meio bucal externo. Portanto, para este parâmetro de degradação, talvez fosse necessário a criação de um tempo zero, no qual as características de tamanho pudessem ser analisadas logo após a inserção *in vivo*.

De acordo com PRATT *et al.* (2002) em estudos experimentais, é preferível a inserção de biomateriais com partículas de tamanhos mais regulares. No presente trabalho, a variação dos tamanhos de partículas, ou diferença entre o mínimo e o máximo (Tab. 4) foi menor para a biocerâmica ($1199,99 \text{ mm}^2 \times 10^{-4}$). Ainda assim, as partículas obtidas do osso ovino apresentaram uma variação bem menor ($S2 = 6098,73 \text{ mm}^2 \times 10^{-4}$) do que as de osso bovino comercial ($L = 17899,99 \text{ mm}^2 \times 10^{-4}$).

O agente aglutinante usado no experimento presente foi o próprio sangue do animal, e nenhum sinal de necrose ou infecção foi observado, apesar da ocorrência de edema. Este fato foi confirmado pela avaliação da massa corporal dos animais no pré e pós-operatório. De acordo com as Figuras 7 e 8, não foram observadas variações significantes no peso, o que sugere que a experimentação não apresentou dano crítico ao funcionamento corporal normal nos animais dos grupos I e II. Apesar dos valores serem diferentes nos grupos V e VI, ao observarmos as Figuras 9, 10, 11 e 12 não foram encontradas grandes variações nas grandezas de massas iniciais e finais para todos os animais. Em praticamente todos os animais destes grupos, notou-se uma leve perda de massa: os animais que receberam o osso ovino autoclavado perderam um máximo de 3,0% da massa corporal em 3 semanas – o que não significou um grande

distúrbio no metabolismo normal. Apenas os animais que receberam o osso ovino esterilizado por óxido de etileno é que curiosamente ganharam quase 10% de massa em 1 semana e perderam 0,6% em 3 semanas, o que pareceu um pouco fora dos padrões anteriores. Ainda, isto aconteceu com o osso ovino esterilizado por óxido de etileno, um biomaterial com provável constituição protéica e/ou antigênica maior do que o osso ovino autoclavado, o que deveria exercer uma reação negativa do organismo receptor em assimilar o biomaterial, especialmente por se tratar de um material com doador de espécie diferente. Talvez, tais diferenças de massa entre os grupos enxertados com Sa e Se possam ser consideradas no momento como casuais, uma vez que nenhuma influência externa sobre os animais foi relatada pelo Biotério do Unicenp, no qual os grupos estiveram confinados.

Ao analisar os grupos V e VI não parcialmente, ou melhor, sem as subdivisões **a** e **b**, como foi realizado com os grupos I e II, obteve-se para o GV um ganho de massa média global de 11,6g ou 2,9%, e uma perda de 7,3g ou 1,8% para o GVI - o que pode ser entendido como baixa a influência sobre o metabolismo geral dos animais da utilização do osso ovino como biomaterial de enxerto.

Sobre os intervalos de monitoramento, NYMAN *et al.* (1995) e ZAHEDI *et al.* (1998) observam resposta tecidual mais significativa em modelos experimentais entre 1 e 4 semanas. Enquanto BOHNING *et al.* (1999) não observa diferenças significantes em períodos mais longos que 3 semanas. Assim, optou-se pelos intervalos de uma e três semanas, usados neste estudo.

Em relação à análise de áreas de exposição de raiz, pode ser apropriado destacar que as remoções de tecido cicatricial foram realizadas pelo mesmo operador em todos os espécimes. Nos Grupos I e II foram usados apenas os espécimes com remoção perfeita para avaliar as áreas de exposição de raiz, enquanto nos Grupos V e VI todos os espécimes foram avaliados. Os Grupos V e VI foram grupos testados posteriormente, utilizando-se o material de imagem coletado de todos os indivíduos, uma vez que os testes nos grupos anteriores auxiliaram no estabelecimento da calibração e padronização dos parâmetros a serem analisados.

Ainda em relação a este parâmetro, pode ser considerado que quanto menor a exposição radicular durante a remoção do tecido cicatricial mais adiantada estaria a recuperação do tecido periodontal, uma vez que uma ligação mais forte com a raiz estaria estabelecida. A comparação entre amostras sugeriu a presença de uma fase inicial de cicatrização do ligamento. Com a consolidação do reparo, o desenvolvimento de um tecido maduro de ligação com a raiz dental deve ser estabelecido, de acordo com relatos de KARIMBUX *et al.* (1995).

Nos grupos I e II, a Figura 13 e a Tabela 6 demonstram esta situação. Resultados dos biomateriais isolados (B e L) sugerem uma demora na remodelação: da semana 1 para a 3, enquanto o controle varia de 11,47% a 3,14% e BL varia de 12,50% a 3,40%, B isoladamente varia de 12,33% a 15,06% e L de 6,16% a 20,10%, ou seja, no uso isolado destes biomateriais a taxa de exposição radicular aumenta. Isto poderia ser explicado pelos dois modos diferentes de ação destes biomateriais.

L pode conter moléculas que inicialmente estimulam o remodelamento positivamente, mas também pode conter moléculas estranhas para a espécie, o que pode atrasar o reparo tecidual. Ainda, L contém poros que facilitariam a migração celular e sua ação. B provê íons importantes para o osso, e no princípio parece preencher o local densamente mais do que realmente contribuir à produção de tecido ósseo. Aparentemente, por ser mais compacta, B poderia dificultar a difusão celular e a neovascularização. Se por um lado isto parece ser negativo, a vantagem de se manter o volume tecidual, permitindo a recuperação da altura e densidades de ossos como a maxila e/ou mandíbula, justificaria seu uso nestes casos.

De acordo com GRIMM *et al.* (2001) a biocerâmica não deve ser aplicada isoladamente, mas sim como material de associação a algum tipo de osso no enxerto. Por isto, a associação destes dois biomateriais parece criar um sinergismo benéfico. Enquanto L facilitaria uma atividade biológica maior, sua reação xenofóbica poderia ser compensada pela abundância de íons de hidroxiapatita em B, o que poderia facilitar a ação do organismo na regeneração do tecido. Este é o mesmo processo que acontece no controle, que possui as moléculas de incentivo à produção de osso como cálcio e fosfato em um tecido altamente vascularizado. Existindo assim uma facilitação da

difusão celular e molecular. Portanto, o controle tem as células precursoras dos tecidos envolvidos (osteoblastos, fibroblastos e cementoblastos), os agentes de incentivo à regeneração (fatores de crescimento), os íons para produzir a porção inorgânica do osso (fosfato e cálcio), e as moléculas para produção de energia e fonte de carbono (oxigênio e carboidratos). O problema clínico deste sistema (coágulo sangüíneo) é sua incapacidade para manter o espaço de remodelamento, o que causa uma perda de volume de tecido. Logo, a inserção de algum biomaterial pode ser considerada crucial quando a manutenção do volume é necessária, principalmente se este parâmetro pode interferir na estética facial, por exemplo. Aparentemente, no que diz respeito ao osso ovino, características similares às aquelas apresentadas para L deveriam estar presentes, mas em graus distintos, uma vez que mesmo que as concentrações dos elementos químicos destes dois biomateriais não fossem aferidas no trabalho atual, de acordo com CARNEIRO *et al.* (2004), pode-se dizer que são realmente individualizadas, e que por isso, as respostas teciduais foram diferentes.

Nos grupos V e VI a exposição radicular (Tab. 9) demonstrou um padrão diferente dos grupos anteriores. Enquanto na semana 1 a exposição mais alta (1Se2 = 30,92%) foi maior do que o dobro daquela anteriormente encontrada (1BL3 = 12,50%), na semana 3 não houve exposição radicular no grupo VI, contrapondo uma maior exposição de 20,10% (3L3) no grupo II. Ou seja, na utilização do osso ovino, a ligação do tecido de reparo adjacente (local de enxerto) com a raiz do incisivo encontrou-se mais firme com o passar do tempo, o que permite inferir que um estágio mais avançado de cicatrização, pelo menos no que diz respeito ao ligamento periodontal, estava presente. Também se pode dizer que, de acordo com as Figuras 13, 16 e 17, a manutenção do volume tecidual foi maior nos grupos V e VI, o que neste caso poderia facilitar a utilização do local de enxerto para outros fins – por exemplo, respeitando-se as etapas de cicatrização obviamente, o uso de implantes dentais poderia ser favorecido. Inúmeros são os relatos de uso clínico de biomateriais anterior ou conjuntamente a procedimentos de implantodontia (CORDIOLI *et al.*, 1999; GARG & VALCANIA, 1999).

De acordo com HULSHOFF *et al.* (1998), a proliferação de osteoblastos *in vitro* pode ser influenciada pela presença de elementos como cálcio e fosfato, e isto pode ser dependente da quantidade. Segundo estes mesmos autores, tais elementos químicos são capazes de ativar a diferenciação e expressão de células osteogênicas que poderiam conduzir a uma neoformação óssea mais rápida. Então, dependendo da quantidade de liberação de íons demonstrada pela biocerâmica do enxerto, esta também poderia ter propriedades de osteoindução. KNABE *et al.* (2000) também demonstram *in vitro* que o β -trifosfato de cálcio da biocerâmica facilita o crescimento de osteoblastos e a secreção de matriz de extracelular, e que por outro lado, grandes quantias destes íons podem inibir o crescimento celular, por exemplo, no uso de biocerâmica CaKPO_4 . BENHAYOUNE *et al.* (2000) demonstram que a degradação de partículas de biomaterial aumenta proporcionalmente ao aumento do número de poros ou irregularidades na superfície do mesmo. Tomando-se por base apenas esta característica, no presente trabalho constatou-se através da microscopia eletrônica de varredura, que as superfícies do osso comercial e do osso ovino eram bem mais regulares do que a superfície da biocerâmica. Apesar disto, os biomateriais de osso demonstraram uma taxa de degradação média maior do que a biocerâmica - obviamente sem levar em consideração as propriedades físico-químicas, uma vez que a biocerâmica não possui conteúdo orgânico, como no caso dos ossos. Esses dados confirmam a proposição de que a falta de poros reduz a atividade celular, conforme descrito anteriormente.

KIHARA *et al.* (1998) em um estudo com MEV, relatam que durante o desenvolvimento ósseo embrionário, antes que fibras de colágeno formem arranjos de feixes regulares, uma rede irregular de fibras é observada. Este padrão de desenvolvimento foi verificado neste estudo. A Figura 21 (3Se3) demonstrou a presença de alguns feixes irregulares; as Figuras 14 (1C e 1B) e 15 (3BL) mostraram a presença de alguns feixes regulares em uma rede irregular na área próxima da superfície radicular; e a Figura 18 (1Sa1) mostrou uma nítida rede de fibras entrelaçadas, como num estágio inicial de formação óssea, osso imaturo ou osteóide (ROSS *et al.*, 1993; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; GENESER, 2003).

SUDA *et al.* (1999) demonstram em MEV que a tensão mecânica à qual um osso é submetido pode influenciar no arranjo das fibras de colágeno, logo, os padrões de fibras/feixes podem ser diferentes entre ossos com baixa tensão (fixos, por exemplo: crânio) e aqueles submetidos a grandes tensões (móveis, por exemplo: mandíbula) – mais uma vez destaca-se a importância da utilização de regiões ósseas submetidas a tensões no estudo de biomateriais de enxerto.

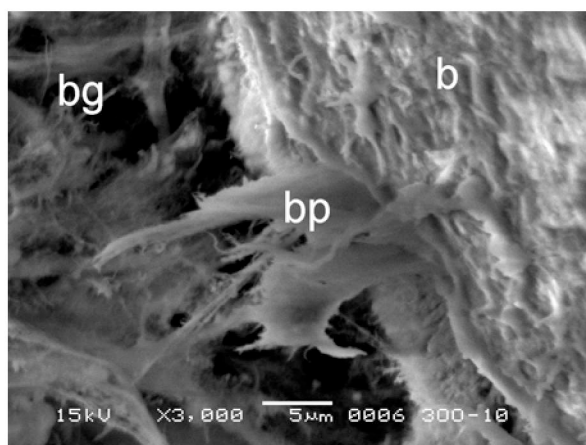
As Tabelas 7 e 10 demonstraram que o diâmetro mínimo de estruturas filiformes na semana 1 foi de 0,07mm (1C), valor inferior à metade do mínimo encontrado com os biomateriais: 0,15mm (1B, 1Sa, 1Se), 0,18mm (1BL) e 0,40mm (1L). A 3 semanas do pós-operatório o controle continuou a apresentar o mesmo resultado (3C = 0,07mm), enquanto os biomateriais demonstraram um padrão menos heterogêneo de metabolismo relacionado às fibras, sendo que a variação foi menor (3L e 3BL = 0,13mm; 3Sa e 3Se = 0,15mm; e 3B = 0,18mm), ou seja, de acordo com a Tabela 12, em 3 semanas o diâmetro das fibras, na presença de biomateriais, foi achado aproximadamente 2-3 vezes maior que o controle (1C/3C).

Concernente aos feixes, os valores para a biocerâmica, osso comercial e associação destes dois foi praticamente o mesmo tanto na semana 1 quanto na 3, com diâmetros em escalas de 2 a 10 vezes menores que o controle, caso que não ocorreu com o osso ovino. Com base na Tabela 12, pode-se verificar que em 1 semana a presença de osso ovino autoclavado levou a diâmetros praticamente iguais aos do controle em valores normalizados (1Sa = 0,9), enquanto que com o osso ovino esterilizado com óxido de etileno os feixes atingiram diâmetros até 20% maiores (1Se = 1,2). Na semana 3 tanto Sa quanto Se demonstraram maiores diâmetros de feixes do que o controle: 1,2 e 1,3 respectivamente. Na Figura 29 observou-se uma projeção, provavelmente orgânica, do tecido ósseo em direção à região do enxerto, na amostra 3Se (osso ovino esterilizado com óxido de etileno, 3 semanas).

Estas variações sugeriram que a inserção de biomaterial pode influenciar a síntese e modelagem de proteínas. Este aspecto foi mais intenso para BL. Nem B ou L usados separadamente aproximaram-se dos diâmetros de C. É provável que as proteínas existentes em L precisem ser substituídas, o que pode atrasar o organismo

na síntese de proteínas nativas substitutivas do material xenogênico. Caso que não ocorreu com o osso ovino, que em relação a este parâmetro, ao contrário do osso comercial, pareceu favorecer o empacotamento das estruturas filiformes unitárias ou a manutenção de feixes organizados da sua própria estrutura. OHLSON *et al.* (1998) e WIKESJO *et al.* (1999) concordam que fatores locais e sistêmicos podem influenciar diferentemente o reparo ósseo.

FIGURA 29 – PROJEÇÃO DO TECIDO ÓSSEO EM DIREÇÃO À REGIÃO DE ENXERTO COM OSSO OVINO ESTERILIZADO COM ÓXIDO DE ETILENO, 3 SEMANAS



(bg) Região do enxerto ósseo. (bp) Projeção tecidual a partir do osso. (b) Osso.

As Figuras 14, 15, 18, 19, 20 e 21 mostraram os padrões de áreas com glóbulos nas diferentes amostras, os quais foram relacionados com a mineralização tecidual. Os percentuais (Tabela 8) de área com glóbulos para o controle em GI e GII (1C = 14,33% e 3C = 17,74%) foram apenas ligeiramente distintos. Valores maiores eram esperados, uma vez que se supõe que a mineralização do tecido cicatricial aumente com o passar do tempo, e se estabilize de acordo com as demandas biomecânicas, e de acordo com a dinâmica da atividade celular do remodelamento ósseo. Isso aconteceu mais claramente com L (1L = 18,38% e 3L = 28,26%), enquanto que na associação de biomateriais a área com glóbulos manteve-se em níveis relativamente altos (1BL =

44,70% e 3BL = 41,97%). A princípio, em relação às amostras com biocerâmica isolada, pareceu que ocorreu a redução de íons da biocerâmica (β -trifosfato de cálcio), o que contribuiria em muito para a formação de glóbulos de reparo (1B = 69,24%), diminuindo com o tempo (3B = 33,84%), uma vez que o biomaterial deve ter sofrido uma grande degradação, como já demonstrado anteriormente. Novamente, o perfil do osso ovino dentro deste parâmetro foi diferente dos demais. De acordo com a Tabela 10, a área com glóbulos em 1 semana foi igual ao controle para 1Sa, e 50% maior para 1Se. Já na semana 3, Sa decresceu em 30% (3Sa = 0,7) e Se chegou a diminuir até 60% em relação ao controle (3Se = 0,4). É necessário considerar que neste parâmetro observou-se apenas glóbulos, ou seja, regiões similares às relatadas por MATSUZAKA *et al.* (1999), que descrevem glóbulos mineralizantes *in vitro*, isto é, regiões de mineralização inicial. Assim, este parâmetro serviu para analisar a capacidade do biomaterial em induzir ou permitir o tecido local à fabricação própria de glóbulos, ou em extrapolação, a capacidade de indução a uma neomineralização. Não foi o que ocorreu com as amostras de osso ovino. É provável que algum fator (ou fatores) presente (s) no enxerto deste biomaterial tenha (m) inibido a neoformação de glóbulos no tecido, pois nitidamente o remodelamento foi diferente dos demais, e apesar de uma menor área com glóbulos, o enxerto de osso ovino permaneceu com maior grau de dureza, uma vez que além daquilo que foi discutido anteriormente (resistência maior à microtomia e maior conteúdo mineral), a região de enxerto demonstrou-se visualmente menos descalcificada.

Por outro lado, a área com glóbulos no sistema de associação (BL) pareceu fornecer condições mais estáveis ao reparo tecidual. Na Tabela 12 os valores comparativos para áreas com glóbulos foram praticamente 3 vezes maiores do que os do controle, sendo observado apenas um pequeno decréscimo a 3 semanas (1BL = 3,1 e 3BL = 2,9).

Ainda no que diz respeito à exposição radicular, as menores áreas foram encontradas em 3Sa e 3Se (0,0 para ambos), consideradas as melhores condições para este parâmetro. Levando-se em conta a manutenção de volume de tecido, isto também sugeriu que o uso do osso ovino foi a melhor opção a 3 semanas do pós-

operatório. No controle, o diâmetro de fibras foi o mais baixo e o de feixes só foi menor do que as amostras de osso ovino, mantendo-se ainda bem maior do que os demais. Isto pode sugerir que a presença de alguns biomateriais parece perturbar a produção organizada de fibras em feixes. De acordo com o discutido antes, fatores locais podem interferir no mecanismo de síntese protéica, o que deve explicar as diferenças encontradas nos parâmetros fibra/feixe entre as amostras. A Figura 14 (1B) mostrou uma grande quantidade de glóbulos aderidos a uma rede de fibras, a taxa mais alta de área com glóbulos, dando a falsa impressão de que o uso isolado de biocerâmica foi a melhor situação para este parâmetro, no entanto, a amostra 3B demonstrou metade da área com glóbulos mostrados em 1B.

Em relação ao diâmetro de defeito, o menor diâmetro pode ser considerado como a melhor situação, visto que se as bordas ósseas estavam mais próximas, significa que houve um crescimento maior da periferia em direção ao centro do defeito. Interessante notar que na maioria das amostras houve uma diminuição do diâmetro, porém, ao mesmo tempo que o osso ovino autoclavado apresentou o maior índice de crescimento periférico, cerca de 64%, o osso ovino esterilizado por óxido de etileno apresentou um crescimento negativo: -200%, ou seja, ao invés de diminuir, o diâmetro médio do defeito nesta amostra dobrou de tamanho. Com base nos valores apresentados pela Tabela 13, outros índices de crescimento periférico podem ser citados, tais como: BL = 40%, B = 33%, C = 20% e L = 11%.

Nesse parâmetro diâmetro de defeito ou crescimento periférico, pode-se dizer que o osso ovino influenciou bastante no remodelamento tecidual, já que um tratamento (Se) levou a um aumento de defeito, provavelmente por estimular uma ação maior de células de reabsorção (osteoclastos, por exemplo), e outro (Sa) levou a um crescimento ósseo periférico pelo menos 30% maior que o encontrado para o controle, estimulando, ao contrário, uma maior deposição óssea, trabalho realizado por osteoblastos (OSBORN & TEN CATE, 1988).

Outros achados da microscopia de luz revelaram que o infiltrado existente em todas as amostras foi do tipo crônico granulomatoso, informação similar ao descrito por OLIVEIRA *et al.* (1999), com presença de células macrofágicas e gigantes

multinucleadas, sendo que o grupo controle apresentou o menor conteúdo desses tipos celulares. Na presença de biomateriais, em 1 semana, aparentemente com exceção de 1B, todas as demais amostras apresentaram alguma célula de inflamação aguda ainda presente (neutrófilos e/ou eosinófilos). Além disto, em todas as amostras a vascularização foi maior do que no grupo controle.

As células gigantes encontradas no presente trabalho podem ser classificadas diferentemente. Na Figura 23F pode-se observar duas células gigantes do tipo corpo estranho, com uma grande quantidade de núcleos dispostos aleatoriamente no citoplasma, enquanto que na figura 25C observou-se uma célula gigante do tipo Langhans, com núcleos periféricos ao citoplasma (CORRÊA, 2005). As células gigantes podem surgir no tecido em casos de infecções e/ou presença de agentes exógenos, como os biomateriais, por exemplo, caracterizando a reação tecidual como granuloma de corpo estranho (RAJAN, 2005). De acordo com OKAMOTO *et al.* (2003), a presença desses dois tipos celulares pode ser influenciada pelo microambiente da lesão, e que ambas as células têm origem dos monócitos ao invés de macrófagos do tecido (histiócitos), sendo fenotipicamente as mesmas células, apenas com distribuição de núcleos diferente. FRANCEY *et al.* (1992) relatam que macrófagos de origem medular são estimulados em seqüência por no mínimo dois fatores: o fator macrofágico colônia-estimulante (M-CSF) e algum outro fator contido no meio.

A proliferação celular mostrou-se intensa nas amostras controle, sendo um pouco mais estrelada (mais indiferenciada e/ou maior atividade celular) do que fusiforme (menos ativo). Em 3B esse aspecto foi similar ao 3C, e com exceção de 3Se, em todas as demais amostras com biomateriais a proliferação se apresentou um pouco mais fusiforme. O que pode indicar uma ocorrência levemente maior de fibroblastos do que de osteoblastos, ou seja, um estágio mais maduro de cicatrização. Mesmo assim, de acordo com ANDRADE *et al.* (1998) fibroblastos e osteoblastos têm a mesma origem e podem se transformar um no outro, dependendo do estímulo, ou do micro-ambiente. Interessante notar, na Figura 24C, a grande similaridade do alinhamento celular ao redor do local ocupado por uma partícula de biocerâmica com osteoblastos ao redor de uma superfície óssea.

De acordo com a Tabela 14, pode-se observar que em todas as amostras um tecido de reparo foi encontrado, com destaque para o controle e o osso ovino autoclavado ambos a três semanas, únicos que demonstraram a presença de osso maduro no local do defeito neste período.

Os resultados obtidos em trabalhos semelhantes a este, de acordo com CAVALIERI *et al.* (2001), podem ajudar na busca das melhores condições de aplicações clínicas dos biomateriais. Outros estudos como a micro-análise de RX e cintilografia óssea (FERREIRA *et al.*, 2002), além da microscopia eletrônica de transmissão e da imunohistoquímica, também devem prover mais informação sobre os processos de reparo periodontais.

Em relação à análise de imagens por computador, outros autores têm descrito a utilização do osso ovino, inclusive a partir do estudo do trabeculado ósseo aplicado à análise de elementos finitos, representando um modelo para simulações genéricas das aferições de forças e estresse em tecidos ósseos (DAGAN *et al.*, 2004).

O presente trabalho representou o início do desenvolvimento de um biomaterial ainda não existente comercialmente. Novos estudos sobre a viabilidade do projeto em escalas maiores ainda são necessários. Há necessidade de se reavaliar o processo de descalcificação do tecido com enxerto de osso ovino. E, além disto, vale à pena inferir que testes com o osso ovino associado à biocerâmica podem resultar em respostas teciduais muito positivas, pois de acordo com GRIMM *et al.* (2001), a biocerâmica (ou β -trifosfato de cálcio) deve ser usada como material coadjuvante de outros biomateriais no enxerto, melhorando a estabilidade mecânica do mesmo.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as considerações anteriores, pode-se concluir com este estudo exploratório que:

De acordo com a microscopia de varredura, todos os biomateriais favoreceram a manutenção do volume tecidual. Também modificaram a síntese e a modelagem de proteínas fibrilares do tecido em cicatrização, e produziram um envolvimento do ligamento periodontal com o processo de reparo. Após 3 semanas de osteopromoção, os enxertos com osso ovino (autoclavado e esterilizado com óxido de etileno) não apresentaram exposição radicular, indicando um estágio cicatricial mais avançado no ligamento.

Com a microscopia de luz foi observado que os biomateriais induziram a uma neoformação vascular maior do que aquela presente nas amostras controle (coágulo sanguíneo). Apresentaram uma proliferação celular mais fusiforme do que estrelada, também indicando um estágio mais maduro de cicatrização, caracterizado pela presença de um granuloma do tipo corpo estranho, com a ocorrência de células inflamatórias e gigantes. Além disto, as partículas de todos os biomateriais de enxerto utilizados neste protocolo sofreram uma considerável degradação, possivelmente mediada por células.

A técnica experimental usada produziu partículas com tamanhos mais homogêneos do que as do osso bovino comercial utilizado. Dentre os dois biomateriais obtidos por métodos distintos de esterilização das partículas, o enxerto com osso ovino autoclavado demonstrou resultados histológicos favoráveis, apresentando inclusive porções de osso maduro no local de reparo em três semanas. Assim, sugeriu-se que o osso ovino mandibular é fonte potencial de biomaterial de enxerto, possuindo um alto teor de cálcio.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M.; CASTRO, E. D.; CASTILLO, S. A. S.; ARAGONES, L. C. A. Inter-relação periodontia e cirurgia parodontológica na solução de casos com envolvimento de grandes perdas ósseas por lesões endo-periodontais. *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia*, n. 15, p. 57-62, 1999.
- ANDRADE, A. L.; BORGES, A. P. B.; BICALHO, S. M. C. M.; et al. *HAP-91 Síntese, Caracterização, Testes e Aplicações*, 1. ed., Belo Horizonte: JHS, 1999. p. 1-52.
- ANDRADE, Z. A.; OLIVEIRA-FILHO, J.; FERNANDES, A. L. M. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an ultrastructural study. *Braz J Med Biol Res*, vol. 31, n. 5, p. 659-664, 1998.
- BARETTA, C. A.; MINELLO, L. F.; MACHADO, I. G. Estudo Histológico Comparativo da Reparação Óssea Pós-Exodôntica de Alvéolo Dentário de Cão Tratado com e sem Biobone. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, vol. 5, n. 4, p. 7-12, 1998.
- BARTEE, B.K.; CARR, J.A. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (ePTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol*, vol. 21, p. 88-95, 1995.
- BENHAYOUNE, H.; JALLOT, E.; BALOSSIER, G.; BONHOMME, P.; FRAYSSINET, P. Integration of dense HA rods into cortical bone. *Biomaterials*, vol. 21, p. 235-42, 2000.
- BOHNING, B.P.; DAVENPORT, W.D.; JEANSONNE, B.G. The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in the rat calvaria. *J Endod*, vol. 25, p. 81-4, 1999.
- BOLANDER, M. E.; BALIAN, G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg*, vol. 68, n. 8, p. 1264-74, 1986.
- BORGHETTI, A.; GLISE, J-M.; MONNET-CORTI, V.; DEJOU, J. Comparative clinical study of a bioabsorbable membrane and subepithelial connective tissue graft in the treatment of human gingival recession. *J Periodontol*, vol. 70, n. 2, p.123-30, 1999.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, vol. 9, p. 310-316, 1998.
- BORDIGNON, A. M. *Seminário Millipore: Princípios Básicos de Filtração e sua Aplicação*, Curitiba: UFPR, 1999.

BRETT, P. M.; PARKAR, M.; OLSEN, I.; TONETTI, M. Expression profiling of periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix proteins in vitro: a model for tissue regeneration. *J Dent Res*, vol. 81, p.776-783, 2002.

BRUNEL, G.; PIAINTONI, P.; ELHARAR, F.; BENQUE, E.; MARIN, P.; ZAHEDI, S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J Periodontol*, vol. 67, n. 12, p.1342-8, 1996.

CAPLANIS, N.; LEE, M. B.; ZIMMERMAN, G. J.; SELVIG, K. A.; WIKESJO, U. M. E. Effect of allogenic freeze-dried demineralized bone matrix on guided tissue regeneration in dogs. *J Periodontol*, vol. 69, n. 8, p.851-6, 1998.

CARNEIRO, B. L.; MATHIAS, S. A.; ZIELAK, J.C.; GIOVANINI, A. F.; MATHIAS, A. L. Análise preliminar de osso bovino e ovino osteopromotores. In: SEMANA ACADÊMICA DE ODONTOLOGIA JÚLIO ESTRELA MOREIRA, XXIV, *Anais da XXIV SAOJEM*, Curitiba: UFPR, 2004.

CARRANZA Jr, F A. *Glickman: Periodontia Clínica*, 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p. 635-40.

CAVALIERI, I.; SÁ-LIMA, J. R.; GOMES, M. F. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos. *Rev Bras Cirurg Implant*, vol. 8, p. 64-70, 2001.

CHENG, M.H.; BREY, E.M.; ALLORI, A.; SATTERFIELD, W. C.; CHANG, D. W.; PATRICK, C. W.; MILLER, M. J. Ovine model for engineering bone segments. *Tissue Eng.*, vol.11, n.1-2, p. 214-25, 2005.

CHIHARA, K.; SUGIMOTO, T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res*, suppl. 48, n. 5, p. 45-9, 1997.

COLLIGNON, H.; DAVICCO, M. J.; BARLET, J. P. Isolation of cells from ovine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during in vitro mineralization. *Arch Physiol Biochem*, vol. 105, n. 2, p. 158-66, 1997.

CORDIOLI, G.; MAJZOUN, Z.; RIACHI, F. Postloading behavior of regenerated tissues in GBR-treated implant sites. *Int J Periodontics Restorative Dent*, vol. 19, n.1, p. 44-55, 1999.

CORRÊA, L. *Pato arte geral inflamação*. Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl.htm>> Acesso em: 13/04/2005.

CRUMP, T. B.; RIVERA-HIDALGO, F.; HARRISON, J. W.; WILLIAMS, F. E.; GUO, I. Y. Influence of three membrane types on healing of bone defects. *O Surgery O Medicine O Pathology O R and E*, vol. 82, n. 4, 1996.

DAGAN, D.; BE'REY, M.; GEFEN, A. Single-trabecula building block for large-scale finite element models of cancellous bone. *Méd Biol Eng Comput*, vol. 42, n. 4, p.549-56, 2004.

DAHLIN, C.; SANDBERG, E.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Restoration of mandibular nonunion bone defects. A n experimental study in rats using a osteopromotive membrane method. *Int J Oral Maxillofac Surg*, vol. 23, n. 4, p.237-42, 1994.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R.; PREWETT, A. B.; HUISMANS, F.; SHORS, E. C.; HOLMES, R. E. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. *J Biomater Appl*, vol. 9, n. 3, p. 275-88, 1995.

DE LEONARDIS, D.; GARG, A. K.; PEDRAZZOLI, V.; PECORA, G. E. Clinical evaluation of treatment of class II furcation involvements with bioabsorbable barriers alone or associated with demineralized freeze-dried bone allografts. *J Periodontol*, vol. 70, n. 1, p. 8-12, 1999.

EDWARDS, J. T.; DIEGMANN, M.H.; SCARBOROUGH, N. L. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop*, vol. 357, p. 219-228, 1998.

FERREIRA, R. I.; DE ALMEIDA, S. M.; BOSCOLO, F. N.; SANTOS, A. O.; CAMARGO, E. E. Bone scintigraphy as an adjunct for the diagnosis of oral diseases. *J Dent Educ*, vol. 66, p. 1381-1387, 2002.

FLECKNELL, P. A. Post-operative analgesia in rabbits and rodents. *Lab. Anim.*, vol. 20, n. 9, p. 34-37, 1991.

FLECKNELL, P. A. *Laboratory Animal Anaesthesia; An Introduction for research workers and technicians*. 2 ed., New York: Academic Press, 1996.

FOX, J. G.; COHEN, B. J.; LOEW, F. M. *Laboratory Animal Medicine*, New York: Academic Press, 1984, p. 564, 569-70.

FRANCEY, T.; JUNGI, T. W.; REY, O.; PETERHANS, E. Culture of ovine bone marrow-derived macrophages and evidence for serum factors distinct from M-CSF contributing to their propagation in vitro. *J LeukocyteBiology*, vol. 51, n. 6, p. 525-34, 1992.

FROUM, S. J.; WEINBERG, M. A.; TARNOW, D. Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. *J Periodontology*, vol. 69, n. 6, 1998.

FUJII, N.; KUSAKARI, H.; MAEDA, T. A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction. *J Periodontology*, vol. 69, n. 4, p. 485-95, 1998.

GARG, A. K.; VALCANIA, T. D. C. Elevação do assoalho do seio maxilar através de enxerto, para colocação de implantes dentais: anatomia, fisiologia e procedimentos. *Revista Brasileira de Cirurgia, Prótese e Implantodontia*, vol. 6, n. 1, p. 53-64, 1999.

GENDLER, E. Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. *J Biomed Mater Res*, vol. 20, p. 687-697, 1986.

GENESER, F. *Histologia. Com bases biomoleculares*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 212-230.

GORDH, M.; ALBERIUS, P.; LINDBERG, L.; JOHNNELL, O. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. *Otaryngol Head Neck Surg*, vol. 117, n. 6, p. 664-70, 1997.

GREENE, E. C. *Anatomy of the Rat*. New York: Hafner, 1959. p. 1-85.

GRIMM, B.; MILES, A. W.; TURNER, I. G. Optimizing a hydroxyapatite/tricalcium-phosphate ceramic as a bone graft extender for impaction grafting. *J Mater Sci Mater Méd*, vol. 12, n. 10/12, p. 929-34, 2001.

HARIS, A. G.; SZABO, G.; ASHMAN, A.; DIVINYI, T.; SUBA, Z.; MARTONFFY, K. Five-year 224-patient prospective histological study of clinical applications using a synthetic bone alloplast. *Implant Dent*, vol. 7, n. 4, 287-99, 1998.

HARRIS, R. J. A clinical evaluation of an allograft combined with a bioabsorbable membrane versus na alloplast/allograft composite graft combined with a bioabsorbable membrane. 100 consecutively treated cases. *J Periodontol*, vol. 69, n. 5, p. 536-46, 1998.

HULSHOFF, J. E. G.; VAN-DIJK, K.; DE-RUIJTER, J. E.; RIETVELD, F. J. R.; GINSEL, L. A.; JANSEN, J. A. Interfacial phenomena: na in vitro study of the effect of calcium phosphate (Ca-P) ceramic on bone formation. *J Biom Mat Res*, vol. 40, p. 464-70, 1998.

JOHNSON, G. S.; MUCALO, M. R.; LORIER, M. A.; GIELAND, U.; MUCHA, H. The processing and characterization of animal-derived bone to yield materials with biomedical applications. PartII: milled bone powders, reprecipitated hydroxyapatite and potential uses of these materials. *J Mater Sci Mater Méd*, vol. 11, n. 11, p. 725-41, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 8ª ed., RJ: Guanabara, 1995, p.108-26.

KARIMBUX, N. Y.; ROSENBLUM, N. D.; NISHIMURA, I. Site –specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. *J Dent Res*, vol. 71, n. 7, p. 1355-62, 1992.

KARIMBUX, N. Y.; SIRAKIAN, A.; WEBER, H. P.; NISHIMURA, I. A new model for molecular biological analysis of the implant-tissue interface: spatial expression of type XVII collagen mRNA around a titanium oral implant. *J Oral Implantol*, vol. 21, p. 107-115, 1995.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 23-74.

KIERNAN, J. A. *histological and Histochemical Methods*. New York: Pergamon Press, 1981.

KIHARA, I.; HASHIMOTO, R.; OTANI, H. Effects of restrained fetal movement on the development of the rat hip joint. *Congenital Anomalies*, vol. 38, p. 259-270, 1998.

KIM, C. K.; CHOI, E. J.; CHO, K. S.; CHAI, J. K.; WIKESJÖ, U. M. E. Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tissue regeneration. *J Periodontol*, vol. 67, n. 12, p. 1301-06, 1996.

KIM, C. K.; CHO, K. S.; CHOI, S. H.; PREWETT, A.; WIKESJÖ, U. M. E. Periodontal repair in dogs: effect of allogenic freeze-dried demineralized bone matrix implants on alveolar bone and cementum regeneration. *J Periodontol*, vol.69, n. 1, p. 26-33, 1998.

KNABE, C.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A.; GILDEHAAR, R.; BERGER, G.; REIF, D.; FITZNER, R.; RADLANSKI, R. J.; GROSS, U. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J Biom Mat Res*, vol. 52, p. 498-508, 2000.

KURUP, H. V.; RAO, P.; PATRO, D. K. Bone allografting: an Indian experience. *Int Orthop*. 2004 Dec;28(6):322-4

KWITEK-BLACK, A. E. The roles of rats functional genomics. *Lab Animal*, vol. 29, n. 3, p. 44-8, 2000.

LAURELL, L.; GOTTLÖW, J.; ZYBUTZ, M.; PERSSON, R. Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. A literature review. *J Periodontol*, vol. 69, n. 3, p. 303-13, 1998.

LES, C.M.; SPENCE, C. A.; VANCE, J. L.; CHRISTOPHERSON, G. T.; PATEL, B.; TURNER, A. S.; DIVINE, G. W.; FYHRIE, D. P. Determinants of ovine compact bone viscoelastic properties: effects of architecture, mineralization, and remodeling. *Bone*, vol. 35, n. 3, p. 729-38, 2004.

LOVELACE, T. B.; MELLONIG, J. T.; MEFFERT, R. M.; JONES, A. A.; NUMMIKOSKI, P. V.; COCHRAN, D. L. Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*, vol. 69, p. 1027-1035, 1998.

LUNDGREN, D.; NYMAN, S.; MATHISEN, T.; ISAKSSON, S.; KLINGE, B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*, vol. 20, n. 6, p. 257-60, 1992.

MACNEILL, S. R.; COBB, C. M.; RAPLEY, J. W.; GLAROS, A. G.; SPENCER, P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol*, vol. 26, n. 4, p. 239-45, 1999.

MATSUZAKA, K.; WALBOOMERS, X. F.; DE RUIJTER, J. E.; JANSEN, J. A. The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*, vol. 20, p. 1293-1301, 1999.

MELLONIG, J. T.; BOWERS, G. M.; BAILEY, R. C. Comparison of bone graft materials. Part I. New bone formation with autografts and allografts determined by strontium-85. *J Periodontol*, vol. 52, n. 6, p. 291-96, 1981.

MELLONIG, J. T.; BOWERS, G. M.; COTTON, W. R. Comparison of bone graft materials. Part II. New bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. *J Periodontol*, vol. 52, n. 6, p. 297-302, 1981.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent*, vol. 2, n. 3, p. 158-67, 1993.

MUELLER, R. J.; RICHARDS, R. G. Immunohistological identification of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human, ovine and bovine bone tissues. *J Mater Sci Mater Méd*, vol. 15, n. 4, p. 367-72, 2004.

NAAMAN, N. B.; OUHAYOUN, J. P. Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: histologic evaluation in rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 13, n. 1, p. 115-20, 1998.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F. A. *Carranza: Periodontia Clínica*, 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 717-736.

NYMAN, R.; MAGNUSSON, M.; SENNERBY, L.; NYMAN, S.; LUNDGREN, D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand*, vol. 66, p.169-173, 1995.

OCHOA, E. R.; VACANTI, J. P. Na overview of the pathology and approaches to tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*, vol. 979, p. 10-26, 2002.

OHLSSON, C.; BENGTSSON, B. A.; ISAKSSON, O. G.; ANDREASSEN, T. T.; SLOOTWEG, M. C. Growth hormone and bone. *Endocr Ver*, vol. 19, p. 55-79, 1998.

OIKARINEN, J.; KORHONEN, L. K. Repair of bone defects by bone inductive material. *Acta Orthop Scand*, vol. 50, n. 1, p. 21-6, 1979.

OKAMOTO, H.; MIZUNO, K.; HORIO, T. Langhans-type and Foreign-body-type Multinucleated Giant Cells in Cutaneous Lesions of Sarcoidosis. *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 83, n. 3, p. 171-174, 2003.

OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C. M.; SILVA, T. L.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D. T. Efeito da temperature de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Rev FOB*, vol. 7, n. ¾, p. 85-93, 1999.

OSBORN, J. W. & TEN CATE, A. R. *Histologia Dental Avançada*. 4 ed. São Paulo : Quintessence, 1988, p. 76-102.

PARASHIS, A.; ANDRONIKAKI-FALDAMI, A.; TSIKLAKIS, K. Comparison of 2 regenerative procedures - guided tissue regeneration and demineralized freeze-dried bone allograft - in the treatment of intrabony defects: a clinical and radiografic study. *J Periodontol*, vol. 69, n. 7, p. 751-58, 1998.

PEKKARINEN, T.; HIETALA, O.; LINDHOLM, T. S.; JALOVAARA, P. Influence of ethylene oxide sterilization on the activity of native reindeer bone morphogenetic protein. *Int Orthop*, vol. 28, n. 2, p. 97-101, 2004.

PRATT, J. N.; GRIFFON, D. J.; DUNLOP, D. G.; SMITH, N.; HOWIE, C. R. Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroxyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects. *Biomaterials*, vol. 23, n. 16, p. 3309-17, 2002.

RABIE, A. B.; LIE KEN JIE, R. K. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. *Int J Oral Maxillofac Surg*, vol. 25, n. 4, p. 311-8. 1996.

RAJAN, T. V. *Foreign Body Giant Cell Reaction?Granuloma*. Disponível em: <<http://pathweb.uchc.edu/eAtlas/Bone/1177.htm>> Acesso em 13/04/2005.

RHODES, N. P.; SRIVASTAVA, J. K.; SMITH, R. F.; LONGINOTTI, C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *J Mater sci Mater Méd*, vol. 15, n. 4, p. 397-402, 2004.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Fundamentos de Robbins, Patologia Estrutural e Funcional*, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 766 p.

RODRIGUEZ, Y.; BAENA, R.; ZAFFE, D.; BRUSOTTI, C.; MARCHETTI, C.; BOTTICELLI, A.; RIZZO, S. Osteo-conductive materials: animal experiments and instrumental analysis II. *Minerva Stomatol*, vol. 46, p. 635-647, 1997.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. *Histologia: texto e atlas*. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p. 141-180.

SCHWARTZ, Z.; SOMERS, A.; MELLONIG, J. T.; CARNES, D. L.; DEAN, D. D.; COCHRAN, D. L.; BOYAN, B. D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *Intern J Oral & Maxillofacial Implants*, vol. 13, n. 1, p. 470-78, 1998.

SERVICE, R. F. Tissue Engineers Build New Bone. *Science*, vol. 289, p.1498-1500, 2000.

SHIMAZU, A.; MORISHITA, M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Periodontal Res*, vol. 38, p.122-129, 2003.

SHIROTA, T.; DONATH, K.; MATSUI, Y.; OHNO, K.; MICHII, K. Reactions of bone tissue in old rats to three different implant materials. *J Oral Implantol*, vol.20, n. 4, p. 307-14, 1994.

SPENCER, E. M.; LIU, C. C.; SI, E. C.; HOWARD, G. A. In vivo actions of insuline-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*, vol.12, n. 1, p. 21-6, 1991.

STUTZLE, H.; HALLFELDT, K.; MANDELKOW, H.; KESSLER, S.; SCHWEIBERER, L. Bone regeneration stimulated by bone substitute materials. *Orthopade*, vol.27, n. 2, p. 118-25, 1998.

SUDA, K.; ABE, K.; KANEDA, K. Changes in the orientation of collagen fibers on the superficial layer of the mouse tibial bone after denervation: scanning electron microscopic observations. *Arch Histol Citol*, vol. 62, p. 231-235, 1999.

SWENNEN, G. R.; EULZER, C.; SCHUTYSER, F.; HUTTMANN, C.; SCHLIEPHAKE, H. Assessment of the distraction regenerate using three-dimensional quantitative computer tomography. *Int J Oral Maxillofac Surg*, vol. 34, n. 1, p. 64-73, 2005.

TROMBELLI, L.; LEE, M. B.; PROMSUDTHI, A.; GUGLIELMONI, P. G.; WIKESJO, U. M. E. Periodontal repair in dogs: histologic observations of guided tissue regeneration with a prostaglandin E1 analog/methacrylate composite. *J Clin Periodontol*, vol. 26, n. 6, p. 381-7, 1999.

VAN DE PUTTE, K. A.; URIST, M. R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop*, vol. 43, p. 257-270, 1965.

VERMINO, A. R.; WANG, H. L.; RAPLEY, J.; NECHAMKIN, S. J.; RIGEINSEN, T. A.; DERHALLI, M.; BREKKE, J. The use of biodegradable polylactic acid barrier materials in the treatment of grade II periodontal furcation defects in humans. Part II: A multicenter investigative surgical study. *Int J Periodontics Restorative Dent*, vol. 19, n. 1, p. 56-65, 1999.

WIKESJO, U. E. M.; GUGLIELMONI, P.; PROMSUDTHI, A.; CHO, K. S.; TROMBELLI, L.; SELVIG, K. A.; JIN, L.; WOSNEY, J. M. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol*, vol. 26, p. 392-400, 1999.

WIXSON, S. K.; WHITE, W. J. et. al. A comparison of Pentobarbital, Fentanyl-Droperdiol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam Anesthesia in Adult Male Rats. *LAS*, vol. 37, n. 6, p. 726-730, 1987.

WLODARSKI, K.; PTASINSKA-URBANSKA, M.; MOSKALEWSKI, S.; JEDRASIEWICZ, B. Comparison of the efficiency of bone induction by decalcified bone matrix in the mouse and rabbit. *Folia Biol (Krakow)*, vol. 22, n. 4, p. 377-8, 1974.

YANG, R.; DAVIES, C. M.; ARCHER, C. W.; RICHARDS, R. G. Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater*, vol. 31, n. 6, p. 57-71, 2003.

YOUSOFI, A. R.; DEHGHANI, S. Using ovine bone xenograft for repairing canine radial bone fractures. *26th WSAVA Congress Proceedings*, Canadá, 2001. Disponível em: <http://www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00251.htm>

YUKNA, R. A.; CALLAN, D. P.; KRAUSER, J. T.; EVANS, G. H.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; MOORE, K.; CRUZ, R.; SCOTT, J. B. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontology*, vol. 69, n. 6, p. 655-63, 1998.

ZAHEDI, S.; LEGRAND, R.; BRUNEL, G.; ALBERT, A.; DEWÉ, W.; COUMANS, B.; BERNARD, J-P. Evaluation of a diphenylphosphorylazide-crosslinked collagen membrane for guided tissue regeneration in mandibular defect of rats. *J Periodontology*, vol. 69, p. 1238-1246, 1998.

ZIELAK¹, J C. Implicações da matriz extracelular sobre o desenvolvimento, manutenção, degeneração e regeneração do ligamento periodontal. *Anais da XVIII SAOGEM-UFPR e do 23º CUBO-USP*, 1998.

ZIELAK², J C; PERACETTA, L F; NICASTRI, A L. Mesa cirúrgica para animais de laboratório em experimentação. *Anais da FeSBE 2000*, res. 34.045, p. 172, 2000.

8 ANEXO: ARTIGO A SER SUBMETIDO

SEM EVALUATION OF ORAL BONE GRAFTING IN A RAT MODEL

*Joao Cesar Zielak, Marcela Calmon de Araujo Goes, Allan Fernando Giovanini,
Ana Lucia Nicastri, Alvaro Luiz Mathias*

Faculty of Dentistry, Positive University Center, Curitiba, Brazil

R Prof Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300
Campo Comprido 81280-330 Curitiba PR Brazil

and

Department of Chemical Engineering, Postgraduation in Biotechnological Processes, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil

Centro Politecnico Caixa Postal 19.011
R Cel Francisco H dos Santos, 100
Curitiba - PR Brazil 81531-990
E-mail: mathias@ufpr.br

Joao Cesar Zielak

Al Dr Muricy 650 cj191
Centro Curitiba PR Brazil 80020-040
Tel.: 55-41-323-5163
Fax: 55-41-317-3030
E-mail: jzielak@unicenp.br

Supported by research grants from Federal University of Parana and Positive
University Center

Keywords: bone grafting, biomaterials, periodontal repair, rat model

Abstract

Oral bone grafting is a procedure widely performed in current Dentistry. Several biomaterials fit this purpose. The aim of this study was to evaluate ultrastructural aspects of bone repair in a rat model, with periodontal tissues involved. Two groups (I and II) of 20 animals each were operated to create a surgical defect on the right side of their mandible, anterior to the mental foramen. Both groups were evenly divided to receive the application of either bioceramic, lyophilized deproteinated bovine bone, bioceramic associated with lyophilized bovine bone, or no biomaterial (control). Group I was monitored for one week and group II for three weeks prior to sacrifice. SEM specimens were prepared and results were analyzed. Parameters such as exposure of incisive root surface, diameter of filiform structures and presence of mineralized-like globuli were detected. The findings of this study suggest that the biomaterials used promoted a periodontal ligament involvement, favored maintenance of tissue volume although slowing remodeling, and that their combination seemed to potentiate the desired repair. The combination of bioceramic with lyophilized deproteinated bovine bone seemed to increase the tissue repair.

Keywords: bone grafting, biomaterials, periodontal repair, rat model

Introduction

Bone grafting is recommended to correct defects of this tissue, which can damage the normal anatomy and, ultimately, its function. Disease or accidents can cause such defects. The bone neoformation in individuals that present considerable loss of tissue is of great importance for Dentistry and Medicine. For example, SERVICE²⁰ reports that approximately 450 thousand bone grafts are performed annually only in

the United States of America. Thus, several substances have been developed with the purpose of stimulating or aiding the neoformation of the original bone, that is to promote an ideal repair in the site of interest.

BOSH et al.⁴ demonstrate that a spontaneous bone reconstruction does not happen in cranial defects of 5mm in diameter, in rats of 5-6 months of age. This suggests that for the repair of large areas an agent of positive response should be added for the bone repair. The so-called osteopromotive substances, bone substitutes, or biomaterials of bone grafting have been studied for a long time. VAN DE PUTTE & URIST²³ already in 1965 study the osteogenesis within intramuscular implants of decalcified bovine bone matrix. GENDLER⁹ studies the use of decalcified bovine bone matrix in subcutaneous implants. Multiple centers of endochondral osteogenesis are observed with subsequent reabsorption of the biomaterial and, later on, its substitution for new bone. RODRIGUEZ et al.¹⁹ find positive results in the use of non-demineralized bovine bone applied in defects of rat tibias with size of 3 mm.

The objective of this work was to evaluate the ultrastructural aspects of bone repair through the *in vivo* study in rats undergone to surgical oral procedures, which involved the periodontal tissues. Two biomaterials were used separately or associated, and the results evaluated by SEM were compared to a control group. The tests were accomplished with two distinctive tissue response types of biomaterials to evaluate the bone repair based on different induction principles. Monitoring time varied to estimate the postsurgical tissue healing.

Material and methods

The surgical procedures were carried out on 40 rats (*Ratus norvegicus*, WISTAR), divided in 2 groups, with 20 animals monitored for one week (group I = GI) and other 20 animals monitored for 3 weeks (group II = GII). The protocol of this study was approved by the Committee of Ethics of Positive University Center, Curitiba,

Brazil. The animals were properly weighed and anesthetized with ketamine (40mg/kg) and xylazine (5mg/kg) IP. An incision at the buccal area and previous to the mental foramen of the right mandible was made with a knife (n.15). A bone defect was created by the action of a round carbide bur with 3mm of diameter coupled in portable apparel in low rotation. The procedure was accomplished with abundant irrigation of sterile saline avoiding the overheating of tissues and allowing a good visualization of the root surface of the inferior incisive, which was defined as the limit of the artificial lesion (Fig. 1). The biomaterial type introduced in the bone defect followed the schedule described in the Table 1. The tissues were sutured with silk 4-0[®]. The same procedure was accomplished with the control animals, except the biomaterial application. Animals were administered postsurgically (24h) with buprenorphine (0.1-0.25 mg/kg PO, BID). Euthanasia of the animals happened at 1 week (GI) and three weeks (GII) postoperatively. The animals were immediately weighed after euthanasia. Hemi-mandibles were harvested and fixed with a freshly 0.03% glutaraldehyde in 0.1 M sodium-cacodylate buffer solution.

After the removal of the superficial tissues (hair, skin and part of oral mucosa), a frontal incision was made on the area of the defect. Cicatricial tissue was clamped and removed (Fig. 2). SEM micrographs were obtained (SEM 505 and XL30, Phillips, Holland). The hystomorfometric parameters were set through the analysis done with UTHSCSA Image Tool 2.00 (The University of Texas Health Science Center, USA), such as areas of root surface exposure and filiform structures (single stuctures as fibers, and group of structures or fibers as bundles). The selection of globuli areas was also done based on the greatest similarity to mineralized globuli *in vitro* by SEM (MATSUZAKA et al.¹⁶), with one sample of each animal being used. The globuli area was manually marked on a plastic film placed over the micrographs. The marked films were scanned and the selected areas were calculated by the software.

Results

The monitoring of the animal weights did not demonstrate significant differences between the beginning of the experiment (presurgical) and immediately after euthanasia for the two groups (Fig. 3, 4). In GI the animals had initial mean mass of 315g and final mean mass of 317g, which was practically the same. This difference was more significant for GII; the initial mean mass was 313g and final mean mass was 325g. The increase in the global mass in GI (2g) was smaller than in GII (13g), although of similar degree. GI also presented minor standard deviation (14.3g) comparing to GII (27g), but not significant in overall terms. The animal 3 in GII demonstrated great mass alteration, although no pathological sign of the graft area was verified, as well as behavior disturbance of the animal. The mass variation of the remaining animals of GII was similar to the one of GI. No infection indications were registered.

The degree of root exposure area was evaluated within the groups (Fig. 5 and Table 2). The global standard deviation for this parameter was 2.04. Although this may relatively seem as a high value, results showed that only C and BL decreased root exposure (1C = 11.47% to 3C = 3.14%, and 1BL = 12.50% to 3BL = 3.40%), while all others increased root exposure areas. It was also possible to observe that in the use of biomaterials tissue volume was higher than in control samples.

Table 3 exhibits the diameter of fibers and bundles, selected from all micrographs showing filiform structures. The single filiform structures with lowest diameters were considered as fibers, which reached mean values ranging from 0.07 to 0.18 μm , except for 1L that presented lowest diameter of 0.40 μm . On the other hand, the group of filiform structures with highest diameters were considered as bundles, which had a great variation of thickness (1BL = 5.37 μm to 1C = 55.82 μm). The highest values were observed for controls (1C = 55.82 μm and 3C = 49.14 μm), while the lowest values were observed for BL (1BL = 5.37 μm and 3BL = 5.62 μm).

According to Figures 6, 7 and Table 4, the smallest globuli area were exhibited by controls of 1 and 3 weeks. While largest areas were observed with the use of biomaterials, mainly in 1B (69.24%). This fact was expected once the bioceramic has an inorganic, compact and dense composition, absorbed slowly. Even so, at the third week a reduction was observed to less than half (3B = 33.84%). 1L (18.38%) presented globuli area slightly larger than 1C (14.33%), but very superior when compared to three weeks' postoperatively (3C = 17.74% and 3L = 28.26%). The association of the biomaterials showed a similar pattern along time (1BL = 44.70% and 3BL = 41.97%).

Discussion

The choice of the rat as a biological model of study confirmed several advantages: easy handle, small costs and fast tissue response.

Regarding the creation of defect, GENDLER⁹ describes a round bur as the option for the simulation on bone. RODRIGUEZ et al.¹⁹ and BOHNING et al.³ also use that, considered better than the trephine bur according to BARTEE & CARR¹. This choice was attributed to the production of non transosteal defects, once the action of the bur was conveniently limited by the root surface of the animal's right incisive. Figure 1 demonstrates the obtained result, a suitable defect for the insertion of biomaterials, at a region perfectly described by GREENE¹⁰.

Also, in relation to the anatomical site chosen for the surgery, other factors influenced in the positive sense of this choice: 1) it is of great interest for Dentistry the study of the bone neoformation aided by biomaterials in the oral cavity, once the masticatory movements and salivation can be important aspects that need to be considered; 2) the use of an anterior area of the oral cavity allows for an intraoral access, just as it is done in the dental clinic (ZAHEDI et al.²⁵); 3) the involvement of the periodontal ligament is frequent in the oral surgery, and it represents an abundant source of stem-cells and other responsible factors for the repair of the periodontium,

as reflected by the scientific community's growing interest in this tissue (BRETT et al.⁵, SHIMAZU & MORISHITA²¹).

The agglutinative agent used was the own blood of the animal and no sign of necrosis or infection was observed. This fact was confirmed by the evaluation of body mass of the animals pre and postoperatively. According to Figures 3 and 4, significant variations were not observed in the weight of the animals, suggesting that the experimentation did not present critical harm to body metabolism.

About monitoring intervals of time, NYMAN et al.¹⁷ and ZAHEDI et al.²⁵ observe significant tissue response in experimental models between 1 and 4 weeks. While BOHNING et al.³ does not observe significant differences in longer periods than 3 weeks. Therefore, one and three weeks' intervals were used in this study.

The selection of the biomaterials was based on the their mechanism of action. The bioceramic (B) used in this work, the phosphate β -tricalcium, is an alloplastic product (synthetic graft biomaterial) with osteoconduction mechanism (LOVELACE et al.¹⁵), which is able to fill the bone defect, guide repair without cell biological activity, and could be absorbed by the organism. On the other hand, the lyophilized deproteinated bovine bone (L) is a xenogenic product (graft biomaterial with different species origin) with osteoinduction mechanism (EDWARDS et al.⁷), able to induce the cell activity, such osteoblast's, accelerating bone neoformation.

Regarding the analysis of root exposure areas, it may be appropriate to point out that clamping of cicatricial tissue was accomplished by the same operator in all specimens, and only specimens with perfect removal were used to evaluate the root exposure areas.

It can be implied that the results from a smaller root exposure area during the removal of the cicatricial tissue were due to a better periodontal tissue recovery. The comparison among samples suggest the presence of an initial cicatricial stage in the ligament, and as consolidation of repair grows the development of a mature tissue connection should be established with the dental root, as report KARIMBUX et

al.¹². Figure 5 demonstrates this situation. Results of the isolated biomaterials (B and L) suggest a lingering on remodeling. This could be explained by the two different methods of action. L can contain molecules that initially stimulate remodeling positively, but it can also contain strange molecules to the species, which may delay the tissue repair. B supplies with important ions for bone, but at first seems to fill the site more densely than really contribute to the production of bone tissue. This can hinder cell diffusion and lack vascularization. If on one side this is negative, the advantage of maintaining the tissue volume that allows for the recovery of height and thickness of maxilla/mandible bones justifies its use in these cases.

The association of the two biomaterials seems to create a beneficial synergism. L would facilitate a larger biological activity and its xenophobic reaction could be compensated by the abundance of hidroxiapatite ions in B, prioritizing the organism action in regenerating the tissue. This is the same process that happens in the control, it has the incentive molecules for bone production as well as calcium and phosphate presented in a highly vascular tissue, facilitating a high cellular and molecular diffusion, such oxygen and carbohydrates. Thus, the control has the precursory cells of the involved tissues (osteoblasts, fibroblasts and cementoblasts), the agents of regeneration incentive (growth factors), the ions to produce the inorganic portion (phosphate and calcium) and the molecules for production of energy and source of carbon. The clinical problem of the control system (blood clot) is its inability to maintain the remodeling space, which causes a loss of tissue volume. Therefore, the insertion of some biomaterial can be considered crucial when volume is necessary to the placement of dental implants, for example.

According to HULSHOFF et al.¹¹ the proliferation of osteoblasts *in vitro* can be influenced by the presence of elements such as calcium and phosphate, depending on the amount. The authors state that these elements are capable to activate the differentiation and expression of osteogenic cells, which could lead to a faster bone neoformation. Therefore, depending on the amount of ion clearance

showed by the grafted bioceramic it could also have osteoinduction properties. KNABE et al.¹⁴ already demonstrate *in vitro* that the bioceramic phosphate β -tricalcium facilitates the osteoblasts growth and the secretion of extracellular matrix, and that large amounts of these ions can inhibit cell growth, for example, in the use of CaKPO_4 bioceramic. BENHAYOUNE et al.² demonstrate that the degradation of biomaterial particles increases proportionally to the increase of the number of pores in the surface of the biomaterial.

KIHARA et al.¹³ in a SEM study of the embryonic bone development report that before collagen fibers form regular bundle arrangements an irregular net of fibers is observed. Figure 6 (1C) shows the presence of some regular bundles in an irregular net, in the area near the root surface. SUDA et al.²² demonstrate by SEM that the mechanical stress affecting bone also influences the arrangement of collagen fibers, and therefore the patterns can be different from those found in fixed bones (e.g. calvaria). Table 3 shows that 1B (0.15mm), 1L (0.40mm) as well as 1BL (0.18mm) have diameters very superior to 1C (0.07mm). At 3 week postoperatively all biomaterials samples show similar pattern of metabolism, presenting mean diameters about 2-3 times larger than 3C/1C. As concerned to bundles, control samples show about 2-10 times larger diameters. This suggests that the insertion of biomaterial may definitively influence the synthesis and modeling of proteins. This aspect was more intense for BL. Neither B nor L alone approached the C bundle diameters. In spite of the existing proteins in L, it is probable that they need to be substituted by the proteins of the organism, which in return seem to delay the synthesis of native proteins for substitution of xenogenic ones. OHLSON et al.¹⁸ and WIKESJO et al.²⁴ agree that local and systemic factors may differently influence the bone repair.

Figures 6 and 7 show the patterns of areas with globuli in the different samples. The percentile (Table 4) of globuli area for control in GI and GII (1C = 14.33% and 3C = 17.74%) were relatively similar. Larger values are expected once

mineralization of the healing tissue is supposed to increase along with time, and to stabilize according to biomechanical demands and dynamics of cellular activity for bone remodeling. That happened more clearly with L (1L = 18.38% and 3L = 28.26%), while with the association of biomaterial globuli area kept relatively high and almost steady (1BL = 44.70% and 3BL = 41.97%). At first, it may seem that when bioceramic is used alone the clearance of ions that may contribute to the formation of globuli is very high (1B = 69.24%), diminishing with time (3B = 33.84%). Within this system it was also likely that the association of the biomaterials may give a more stable condition for tissue repair.

Table 5 summarizes the observed phenomena normalized in relation to 1C. Considering root exposure, the smallest areas, therefore best condition for this parameter, were 3C and 3BL (0.3, both). Taking into account the maintenance of tissue volume, this suggests that the association of these biomaterials was the best option at 3 week postoperatively. The diameter of fibers was lowest and of bundles was highest for the controls (GI and GII). This may suggest that the synthesis of fibers is prevalent in the natural bone repair. Thus, the fibers are formed, but in a more organized way in the control groups, which has the prone environment for the production of more voluminous bundles formed by fine fibers. The biomaterial presence seems to disturb the organized production of fibers. Fibers may be produced thicker to counteract the biomechanical forces to which the tissue is subordinated, this may also hinder the organized aggregation to produce the thicker bundles. Figure 6 (1B) shows a great amount of globuli adhered to a net of fibers. The highest rate of globuli area can resemble the best situation, but in this case, the difficulty of mineral absorption from the biomaterial, mainly the isolated bioceramic, can create the false impression that B alone is the best graft.

Therefore, the findings of this study suggest that the biological model used well-simulated the oral clinical conditions, the used biomaterials promoted a periodontal ligament involvement, favored maintenance of tissue volume although

slowing remodeling, and that their combination in equal parts seemed to potentiate the desired repair. The results obtained from similar tests, according to CAVALIERI et al.⁶, can aid in the search for the best conditions in clinical applications of biomaterials. Other studies such X-ray microanalysis, optical microscopy and bone scintigraphy (FERREIRA et al.⁸) should also supply with more information about the periodontal repair processes.

References

1. BARTEE BK, CARR JA. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (ePTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol* 1995; **21**: 88-95.
2. BENHAYOUNE H, JALLOT E, BALOSSIER G, BONHOMME P, FRAYSSINET P. Integration of dense HA rods into cortical bone. *Biomaterials* 2000; **21**: 235-42.
3. BOHNING BP, DAVENPORT WD, JEANSONNE BG. The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in the rat calvaria. *J Endod* 1999; **25**: 81-4.
4. BOSCH C, MELSEN B, VARGERVIK K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; **9**: 310-316.
5. BRETT PM, PARKAR M, OLSEN I, TONETTI M. Expression profiling of periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix proteins in vitro: a model for tissue regeneration. *J Dent Res* 2002; **81**: 776-783.
6. CAVALIERI I, SÁ-LIMA J R, GOMES MF. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos. *Rev Bras Cirurg Implant* 2001; **8**: 64-70.

7. EDWARDS JT, DIEGMANN MH, SCARBOROUGH NL. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. Clin Orthop 1998: **357**: 219-228.
8. FERREIRA RI, DE ALMEIDA SM, BOSCOLO FN, SANTOS AO, CAMARGO EE. Bone scintigraphy as an adjunct for the diagnosis of oral diseases. J Dent Educ 2002: **66**: 1381-1387.
9. GENDLER E. Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. J Biomed Mater Res 1986: **20**: 687-697.
10. GREENE EC. Anatomy of the Rat. New York: Hafner, 1959: 1-85.
11. HULSHOFF JEG, VAN-DIJK K, DE-RUIJTER JE, RIETVELD FJR, GINSEL LA, JANSEN JA. Interfacial phenomena: an in vitro study of the effect of calcium phosphate (Ca-P) ceramic on bone formation. J Biomater Res 1998: **40**: 464-474.
12. KARIMBUX NY, SIRAKIAN A, WEBER HP, NISHIMURA I. A new model for molecular biological analysis of the implant-tissue interface: spatial expression of type XVII collagen mRNA around a titanium oral implant. J Oral Implantol 1995: **21**: 107-115.
13. KIHARA I, HASHIMOTO R, OTANI H. Effects of restrained fetal movement on the development of the rat hip joint. Congenital Anomalies 1998: **38**: 259-270.
14. KNABE C, DRIESSENS FCM, PLANELL JA, GILDEHAAR R, BERGER G, REIF D, FITZNER R, RADLANSKI RJ, GROSS U. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. J Biomater Res 2000: **52**: 498-508.
15. LOVELACE TB, MELLONIG JT, MEFFERT RM, JONES AA, NUMMIKOSKI PV, COCHRAN DL. Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. J Periodontol 1998: **69**: 1027-1035.

16. MATSUZAKA K, WALBOOMERS XF, DE RUIJTER JE, JANSEN JA. The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 1999; **20**: 1293-1301.
17. NYMAN R, MAGNUSSON M, SENNERBY L, NYMAN S, LUNDGREN D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1995; **66**: 169-173.
18. OHLSSON C, BENGTSSON BA, ISAKSSON OG, ANDREASSEN TT, SLOOTWEG MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998; **19**: 55-79.
19. RODRIGUEZ Y, BAENA R, ZAFFE D, BRUSOTTI C, MARCHETTI C, BOTTICELLI A, RIZZO S. Osteo-conductive materials: animal experiments and instrumental analysis II. *Minerva Stomatol* 1997; **46**: 635-647.
20. SERVICE RF. Tissue Engineers Build New Bone. *Science* 2000; **289**: 1498-1500.
21. SHIMAZU A, MORISHITA M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Periodontol Res*. 2003; **38**: 122-129.
22. SUDA K, ABE K, KANEDA K. Changes in the orientation of collagen fibers on the superficial layer of the mouse tibial bone after denervation: scanning electron microscopic observations. *Arch Histol Citol* 1999; **62**: 231-235.
23. VAN DE PUTTE KA, URIST MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop* 1965; **43**: 257-270.
24. WIKESJO UEM, GUGLIELMONI P, PROMSUDTHI A, CHO KS, TROMBELLI L, SELVIG KA, JIN L, WOSNEY JM. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 392-400.
25. ZAHEDI S, LEGRAND R, BRUNEL G, ALBERT A, DEWÉ W, COUMANS B, BERNARD J-P. Evaluation of a diphenylphosphorylazide-crosslinked

collagen membrane for guided tissue regeneration in mandibular defect of rats. J Periodontology 1998; **69**: 1238-1246.



Fig. 1. Surgical defect limits



Fig. 2. Clamping of over-defect tissue

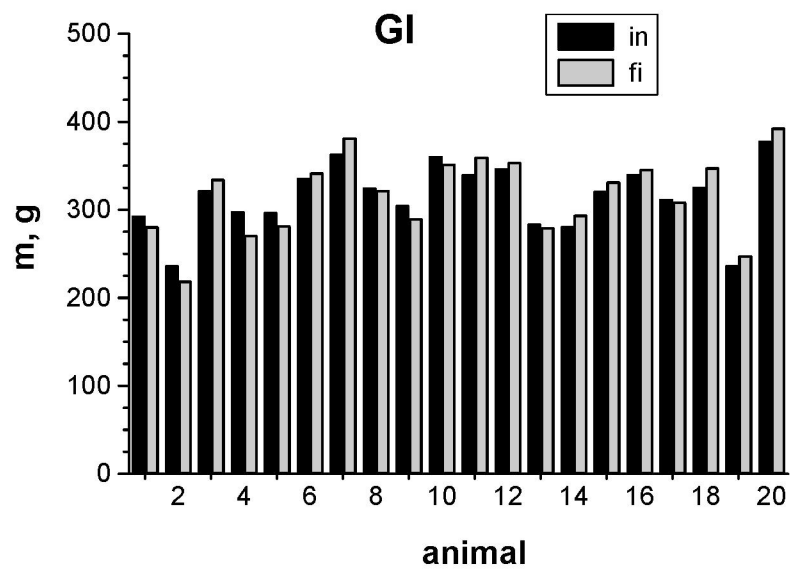


Fig. 3. Monitoring of body mass for GI. In; initial mass. Fi; final mass.

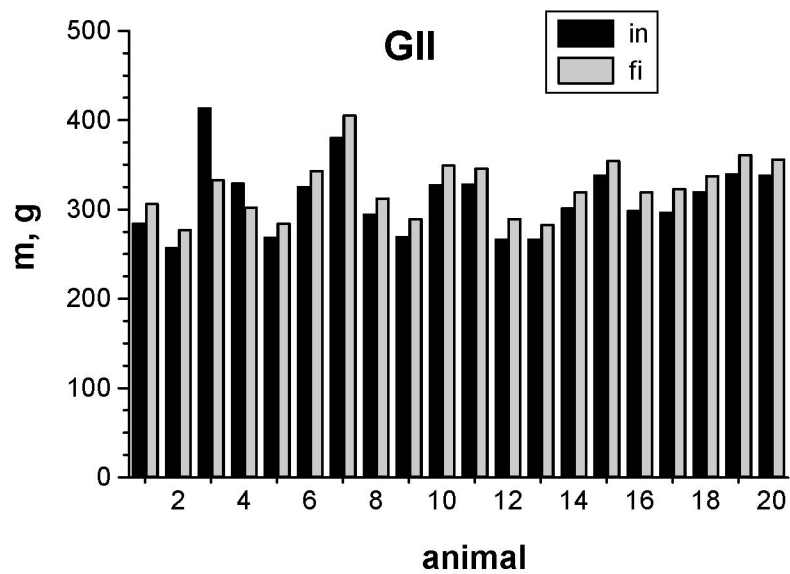


Fig. 4. Monitoring of body mass for GII. In; initial mass. Fi; final mass.

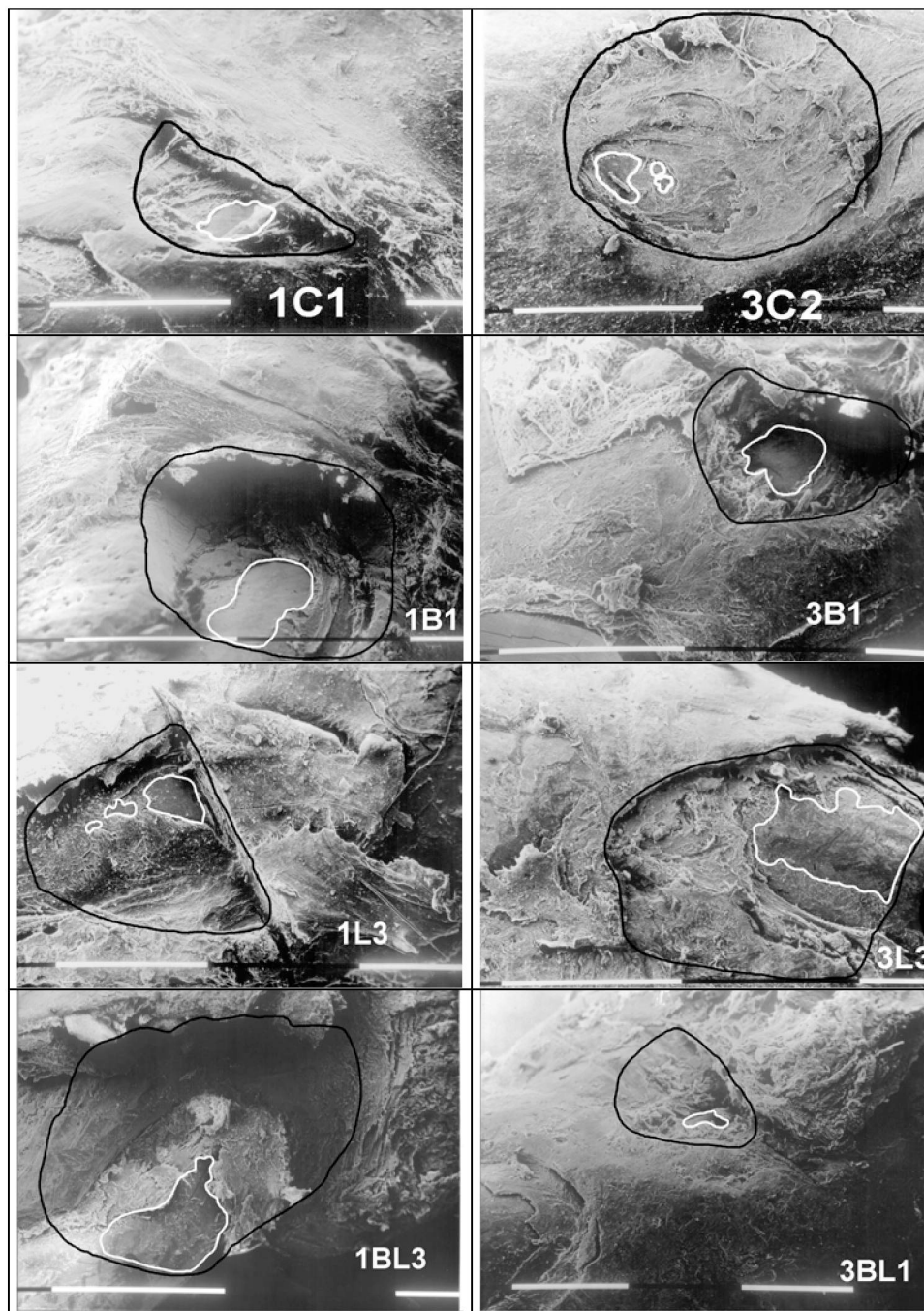


Fig. 5. Black line; defect exposed area. White line; root exposed area. 1C1; control 1st. week animal 1. 3C2; control 3rd. week animal 2. 1B1; bioceramic 1st. week animal 1. 3B1; bioceramic 3rd. week animal 1. 1L3; lyophilized bone 1st. week animal 3. 3L3; lyophilized bone 3rd. week animal 3. 1BL3; bioceramic + lyophilized bone 1st. week animal 3. 3BL1; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week animal 1.

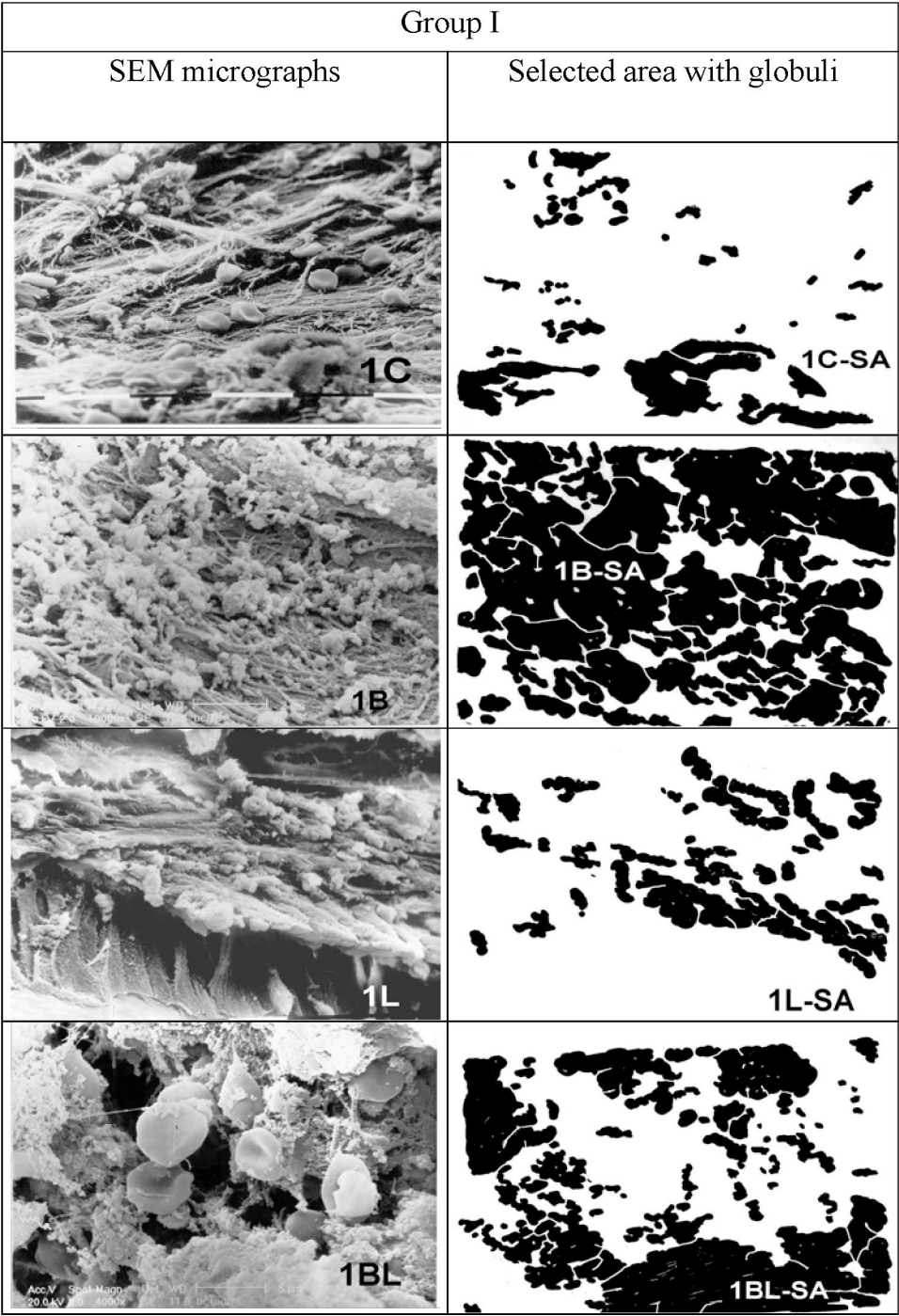


Fig. 6. Comparison of globuli areas within GI. 1C; control 1st. week. 1C-SA; control 1st. week selected area. 1B; bioceramic 1st. week. 1B-SA; bioceramic 1st. week selected area. 1L; lyophilized bone 1st. week. 1L-SA; lyophilized bone 1st. week selected area. 1BL; bioceramic + lyophilized bone 1st. week. 1BL-SA; bioceramic + lyophilized bone 1st. week selected area.

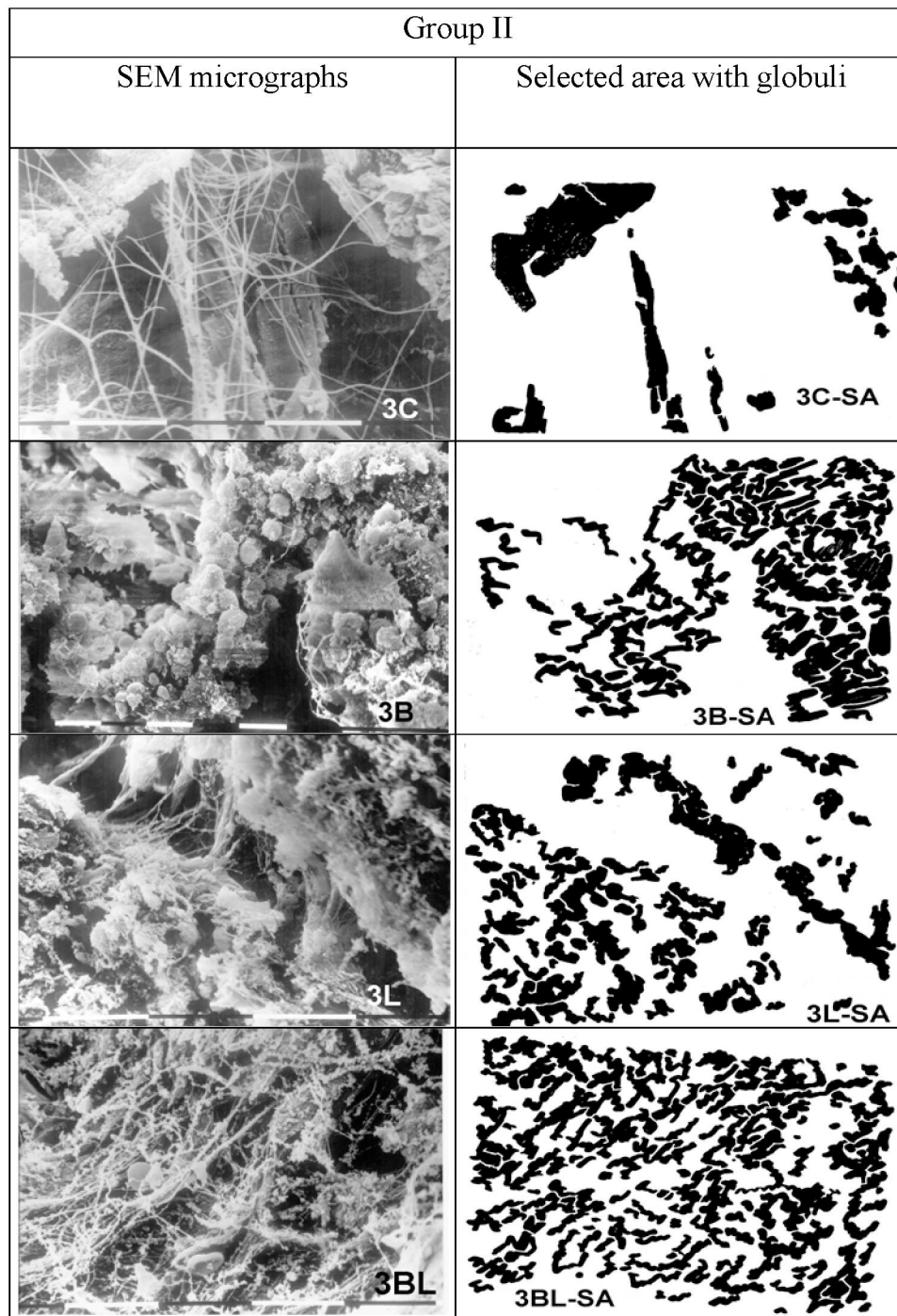


Fig. 7. Comparison of globuli areas within GII. 3C; control 3rd. week. 3C-SA; control 3rd. week selected area. 3B; bioceramic 3rd. week. 3B-SA; bioceramic 3rd. week selected area. 3L; lyophilized bone 3rd. week. 3L-SA; lyophilized bone 3rd. week selected area. 3BL; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week. 3BL-SA; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week selected area.

Table 1. Surgical schedule and application of biomaterials

Group	Euthanasia (weeks)	Animals	Biomaterial
GI	1	01-05 (1-5)	C
		06-10 (1-5)	B
		11-15 (1-5)	L
		16-20 (1-5)	BL
GII	3	01-05 (1-5)	C
		06-10 (1-5)	B
		11-15 (1-5)	L
		16-20 (1-5)	BL

C; control (no biomaterial applied). L; lyophilized deproteinated bovine bone®.
 B; bioceramic, calcium- β -triphosphate®. BL; mixture of lyophilized bone and bioceramic
 in equal parts.

Table 2. Values (%) of root exposure area in relation to defect area

Sample	Defect exposed area (mm ²), black	Root exposed area (mm ²), white	Exposure (%)
1C1	0.61	0.07	11.47
1B1	1.54	0.19	12.33
1L3	1.46	0.09	6,16
1BL3	2.08	0.26	12,50
3C2	1.91	0.06	3,14
3B1	0.73	0.11	15.06
3L3	1.84	0.37	20.10
3BL1	0.88	0.03	3.40

1C1; control 1st. week animal 1. 3C2; control 3rd. week animal 2. 1B1; bioceramic 1st. week animal 1. 3B1; bioceramic 3rd. week animal 1. 1L3; lyophilized bone 1st. week animal 3. 3L3; lyophilized bone 3rd. week animal 3. 1BL3; bioceramic + lyophilized bone 1st. week animal 3. 3BL1; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week animal 1.

Table 3. Diameter of fibers/bundles observed by SEM

Overall samples*	Diameter, μm	
	Minimum (fiber)	Maximum (bundle)
1C	0,07	55,82
1B	0,15	28,56
1L	0,40	13,01
1BL	0,18	5,37
3C	0,07	49,14
3B	0,18	19,57
3L	0,13	17,59
3BL	0,13	5,62

*Micrographs from all samples that showed filiform structures. 1C; control 1st. week. 3C; control 3rd. week. 1B; bioceramic 1st. week. 3B; bioceramic 3rd. week. 1L; lyophilized bone 1st. week. 3L; lyophilized bone 3rd. week. 1BL; bioceramic + lyophilized bone 1st. week. 3BL; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week .

Table 4. Estimated globuli area by SEM

Sample*	Selected area (SA), μm^2	Globuli area, %
1C	349,45	14,33
1B	1934,14	69,24
1L	746,69	18,38
1BL	329,41	44,70
3C	340,8	17,74
3B	2549,93	33,84
3L	403,21	28,26
3BL	669,8	41,97

*Samples with the greatest similarity to mineralized globuli *in vitro*. 1C; control 1st. week. 3C; control 3rd. week. 1B; bioceramic 1st. week. 3B; bioceramic 3rd. week. 1L; lyophilized bone 1st. week. 3L; lyophilized bone 3rd. week. 1BL; bioceramic + lyophilized bone 1st. week. 3BL; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week .

Table 5. Characteristics of tissue repair normalized to control 1 week

Sample	Root exposure	Fibers	Bundles	Globuli area
1C	1,0	1,0	1,0	1,0
1B	1,1	2,1	0,5	4,8
1L	0,5	5,7	0,2	1,3
1BL	1,1	2,6	0,1	3,1
3C	0,3	1,0	0,9	1,2
3B	1,3	2,6	0,4	2,4
3L	1,8	1,9	0,3	2,0
3BL	0,3	1,9	0,1	2,9

1C; control 1st. week. 3C; control 3rd. week. 1B; bioceramic 1st. week. 3B; bioceramic 3rd. week. 1L; lyophilized bone 1st. week. 3L; lyophilized bone 3rd. week. 1BL; bioceramic + lyophilized bone 1st. week. 3BL; bioceramic + lyophilized bone 3rd. week .